



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

Genotipificación de los linajes del virus de distemper canino presente en perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) de Lima Metropolitana

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Luis Cesar GUTIERREZ PAUCAR

ASESOR

Alberto Gustavo MANCHEGO SAYÁN

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Gutierrez L. Genotipificación de los linajes del virus de distemper canino presente en perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) de Lima Metropolitana [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2020.

Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	https://orcid.org/0000-0002-4652-9167
DNI o pasaporte del autor	46864980
Código ORCID del asesor	https://orcid.org/0000-0002-8199-0418
DNI o pasaporte del asesor	15619652
Grupo de investigación	“—”
Agencia financiadora	
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	Perú, Lima, Lima, Av Circunvalación 28, San Borja 15021 Coordenadas: Latitud: -12.081088 Longitud: -76.987293
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018 - 2019
Disciplinas OCDE	Ciencia veterinaria http://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS EN MODALIDAD VIRTUAL
PARA OPTAR EL TÍTULO DE MEDICO VETERINARIO
Autorizado por R.D N° 304-D-FMV-2020**

1. FECHA DE LA SUSTENTACIÓN 13/11/2020

HORA INICIO: 10:00 a.m.

HORA TÉRMINO: 11:25 am

2. MIEMBROS DEL JURADO

PRESIDENTE: **Blg. Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández**

MIEMBRO: **MV. Mg Luis Ramiro Luna Espinoza**

MIEMBRO: **MV. Mg. Mercy Gisela Ramírez Velásquez**

ASESOR: **MV. Mg. Alberto Gustavo Manchego Sayán**

3. DATOS DEL TESISTA

APELLIDOS Y NOMBRES: **GUTIERREZ PAUCAR, LUIS CESAR**

CÓDIGO: 14080007

R.R. DE GRADO DE TESISTA NÚMERO: **N° 013719-2020-R/UNMSM**

TÍTULO DE LA TESIS: **“GENOTIPIFICACIÓN DE LOS LINAJES DEL VIRUS DEL DISTEMPER CANINO
PRESENTE EN PERROS DOMÉSTICOS (*Canis lupus familiaris*) DE LIMA METROPOLITANA”**

4. RECOMENDACIONES

Datos de la plataforma virtual institucional del acto de sustentación: <https://>

ID:

Grabación archivada en:

5. NOTA OBTENIDA: 18 (en números), DIECIOCHO (en letras)

6. PÚBLICO ASISTENTE: (Nombre, apellido y DNI)

Fecha: viernes 13 de noviembre de 2020

Bach. GUTIERREZ PAUCAR, LUIS CESAR

Título: “GENOTIPIFICACIÓN DE LOS LINAJES DEL VIRUS DEL DISTEMPER CANINO PRESENTE EN PERROS DOMÉSTICOS (*Canis lupus familiaris*) DE LIMA METROPOLITANA”

TESISTA	1	Luis Gutiérrez Paucar	luis.gutierrez2@unmsm.edu.pe
JURADO	2	Lenin Maturrano Hernández	amaturrano@unmsm.edu.pe
	3	Alberto Manchego Sayán	amanchegos@unmsm.edu.pe
	4	Mercy Ramírez Velázquez	mramirezv@unmsm.edu.pe
	5	Luis Luna Espinoza	llunae@unmsm.edu.pe
MODERADOR	6	Luis Cerro Temoche	lcerrot@unmsm.edu.pe
COMITÉ DE SUSTENTACIONES	7	Faride Altamirano Zevallos	faltamirano@unmsm.edu.pe
	8	Luis Hoyos Sifuentes	luis.hoyos@unmsm.edu.pe
SOLICITUD DE ASISTENCIA DOCENTES	9	Miguel Angel Montes Rojas	mrojasmontes@gmail.com
	10	Dennis Navarro Mamani	dnavarrom@unmsm.edu.pe
SOLICITUD DE ASISTENCIA ESTUDIANTES	11	Elizabeth Quispe Garay	elizabeth.quispe11@unmsm.edu.pe
	12	Jacqueline Ascona Litano	jacquelinee.ascona@unmsm.edu.pe
	13	Erland Gutarra Capcha	erland.gutarra@unmsm.edu.pe
INFORMÁTICA	14	Andrés Trujillo Peña	informatica.fmv@unmsm.edu.pe

7. FIRMAS DE LOS MIEMBROS DEL JURADO

 <p>Firmado digitalmente por MATURRANO HERNÁNDEZ Abelardo Lenin FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 16.02.2021 16:19:44 -05:00</p> <p>Firma</p>
<p>Blg. Dr. Maturrano Hernández Abelardo Lenin PRESIDENTE</p>

 <p>Firmado digitalmente por MANCHEGO SAYAN Alberto Gustavo FAU 20148092282 soft Motivo: Soy el autor del documento Fecha: 18.02.2021 17:33:37 -05:00</p> <p>Firma</p>	 <p>Firma</p>	 <p>Firma</p>
<p>MV. Mg. Manchego Sayán Alberto Gustavo Apellidos y Nombres</p>	<p>MV. Mg. Ramírez Velásquez Mercy Gisela Apellidos y Nombres</p>	<p>MV. Mg. Dr. Luna Espinoza Luis Ramiro Apellidos y Nombres</p>
<p>ASESOR DE LA TESIS</p>	<p>MIEMBRO JURADO</p>	<p>MIEMBRO JURADO</p>

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mi familia, que ha sido el empuje y la motivación para seguir esforzándome y lograr la culminación de este trabajo; a mis padres que me brindaron la mejor herencia, “La educación” ; también de manera especial, a mi querida tía Julia, mujer llena de virtudes y valores que dedicó parte de su tiempo, su comprensión y constante motivación para poder culminar de manera exitosa los años universitarios , a mi tío David; que fue pieza fundamental para el desarrollo profesional de la carrera, sin su apoyo no lo hubiese logrado.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Vida por brindarme salud y por poner en mi camino a personas tan maravillosas que aportaron en la realización de esta tesis.

Al Dr. Alberto Manchego Sayán; asesor de tesis, por la confianza, amistad y orientación para la realización del presente trabajo.

Al Dr. Miguel Ángel Rojas, por su amistad y guía desde el inicio hasta la conclusión del proyecto

A quienes son considerados como parte de mi familia; Jacqueline, Martha, Rafael, Jorge, Ricardito y Erland. Por ser parte importante en mi desarrollo profesional.

A Jenny, Laura y Jacky; por su amistad.

Al Sr. Roberto Choque, Sr. Pascual y al Sr. Vicente.

A la Sra. María por los tantos desayunos, almuerzos y cenas en “Moscú”.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO.....	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE CUADROS	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1. Etiología.....	2
2.2. Estructura del Virus del Distemper Canino	3
2.2.1. Proteínas virales.....	5
2.3. Hospederos	7
2.4. Transmisión y diseminación.....	8
2.5. Susceptibilidad y factores de riesgo	9
2.6 Epidemiología.....	9
2.7. Diversidad genética	10
2.8. Patogénesis	11
2.9. Cuadro clínico.....	14
2.10. Diagnóstico	16
2.10.1. Diagnóstico Clínico presuntivo.	16
2.10.2. Ensayos serológicos.	16
2.10.3. Aislamiento Viral.....	17
2.10.4. Reacción de transcripción inversa en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	17
2.11. Tratamiento.....	18
2.12. Prevención y control	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Lugar de estudio	21
3.2. Toma y procesamiento de muestras	21
3.2.1. Información de los individuos de estudio.....	21
3.2.2. Tamaño muestral	22
3.2.3. Colección de muestras.....	23

3.2.4. Extracción de ARN viral	24
3.2.5. Identificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT- PCR)	25
3.3. Análisis de la información	30
4. RESULTADOS	31
5. DISCUSIÓN	41
6. CONCLUSIONES.....	45
7. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	46
8. ANEXOS	56

RESUMEN

El virus del distemper canino (VDC), es considerado el agente viral de mayor importancia que afecta a la especie canina, reportándose hasta la fecha 19 linajes de este virus circulando en todo el mundo. El objetivo principal de este estudio es detectar e identificar los diferentes linajes del virus de distemper canino (VDC) que circulan en Lima metropolitana. Se emplearon 36 muestras de orina de perros con diagnóstico clínico presuntivo de distemper canino atendidos en la Clínica Veterinaria de Animales Menores de la FMV-UNMSM durante el periodo de agosto del 2018 a diciembre del 2019 y se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) amplificando un fragmento conservado del gen de la nucleocápside (N) del virus dentro de las muestras procesadas para la detección viral. Posteriormente a las muestras positivas se les realizó una RT-PCR para la amplificación y secuenciamiento del gen de la hemaglutinina (H) viral para determinar su linaje mediante un análisis filogenético. El 41.7% (15/36) de las muestras fueron positivas al VDC. Las muestras positivas fueron sometidas al secuenciamiento del gen H, obteniendo las secuencias del 73.3% (11/15) de las muestras positivas para su posterior análisis filogenético. El análisis filogenético de las 11 secuencias de aminoácidos de las cepas virales obtenidos demuestra la presencia de dos linajes circulando en Lima metropolitana, 3 secuencias pertenecientes al linaje América 1 presentando 100% a 98.9% de identidad de aminoácidos al ser comparado con la cepa padrón vacunal Onderstepoort y 8 secuencias que están filogenéticamente más relacionadas al linaje “America 4” con 95% a 96% de identidad de aminoácidos al ser comparados con las únicas secuencias de este linaje 13-2262 y 13-1941, el valor de corte en porcentaje de aminoácidos para determinar una cepa dentro de un linaje de VDC es mínimo 96.5% de identidad de aminoácidos. El trabajo sugiere la presencia de un nuevo linaje de VDC que circula en Lima Metropolitana, con la posibilidad de proponer un nuevo linaje denominado “South America 5”.

Palabras Clave: Distemper canino, RT-PCR, Linajes, Genotipos, Análisis filogenético.

ABSTRACT

Canine Distemper Virus (CDV), is considered the most important viral agent that affects canine species, 19 lineages has been reported of this virus circulating around the world. The main objective of this study is detect and identify the different lineages of the Canine Distemper Virus (CDV) that are around Metropolitan Lima. 36 urine samples were used from dogs with a presumptive clinical diagnosis of Canine Distemper, whom were treated at the Small Animals Veterinary Clinic of the FMV-UNMSM during the period between august 2018 to december 2019; the reverse transcription- polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to amplify a gene conserved fragment of the virus nucleocapsid (N) inside the samples processed for viral detection. Subsequently, the positive samples underwent RT-PCR to amplify and sequence the viral hemagglutinin (H) gene and determine their lineage by means of phylogenetic analysis. 41.7% (15/36) of the samples were positive for CDV. Positive samples were subjected to H gene sequencing, obtaining the sequences of 73.3% (11/15) for subsequent phylogenetic analysis. The phylogenetic analysis obtained of the 11 amino acid sequences of the viral strains shows the presence of two lineages circulating in Metropolitan Lima, 3 sequences belong to the America-1 lineage with 100% to 98.9% amino acid identity in relation to the Onderstepoort vaccine standard strain. Moreover, 8 sequences that are more phylogenetically related to the "America-4" lineage with 95% to 96% amino acid identity when compared with the only sequences of this lineage 13-2262 and 13-1941, the cutoff value in percentage of amino acids to determine a strain within a CDV lineage is at least 96.5% amino acid identity. The study suggests the presence of a new CDV lineage circulating in Metropolitan Lima with the possibility to propose a new lineage named "South America-5".

Key words: Canine Distemper, RT-PCR, lineage, Gene, phylogenetic analysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del virión de un morbilivirus (Sarute, 2013).	3
Figura 2. Representación esquemática del genoma del VDC indicando los 6 genes (N, P, M, F, H y L) que lo sintetizan las proteínas estructurales y los 2 genes (C y V) que codifican las proteínas no estructurales del virus (Sarute, 2013).	4
Figura 3. Mecanismo de transcripción de los morbilivirus.(Sarute, 2003).	5
Figura 4. <i>Mecanismo de fusión entre el virus y la célula: intervención de la hemaglutinina y la proteína de fusión (Messling et al., 2001)</i>	7
Figura 5. Secuencia de la patogenia del virus del distemper canino al Sistema Nervioso Central (Greene y Apple, 2006).	13
Figura 6. Razones asociadas a fallas en la vacunación (Sarute, 2013)	20
Figura 7. Resultado de la amplificación de la Nucleoproteína de 287 pb por RT-PCR de 9 de los casos con signos clínicos compatibles con DC. PM: Peso Molecular de 100pb; D19 - D27 Muestras. DH: control positivo (vacuna), N: control negativo.....	34
Figura 8. Resultado de la amplificación de la Hemaglutinina de 768 pb por RT-PCR de 11 de los casos positivos a distemper.	35
Figura 9. Se observan las 11 muestras positivas a DC que fueron secuenciadas junto a las 2 vacunas empleadas como control positivo (cepa Onderstepoort). Del secuenciamiento parcial se obtuvo como resultado dos grupos: Linaje América 1 (cepa Onderstepoort) DH, DP, D11, D12 y D26; Linaje América 4: D6, D18, D23, D25, D28,D29, D31, D36.	36
Figura 10. Dendograma construido a partir de las secuencias parciales de la Hemaglutinina (768 pb) de los diferentes genotipos del virus de distemper canino.	37
Figura 11. Resultado de la amplificación del gen completo Hemaglutinina de 1824pb por RT-PCR de 11 de los casos positivos a distemper.	38
Figura 12. Dendograma construido a partir de las secuencias completas de la Hemaglutinina de los diferentes genotipos del virus de distemper canino.	40

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Signos presentes en los perros muestreados. SR: Signo respiratorio, SGI: Signo gastrointestinal, SN: signo nervioso, Conj: Signo ocular, Dx: (Diagnóstico).	22
Cuadro 2. secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de la	26
Cuadro 3. Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de la Hemaglutinina. Pb*= pares de bases (Si et al., 2010).	28
Cuadro 4. Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de la Hemaglutinina. Pb*= pares de bases (Si et al., 2010).	29
Cuadro 5. Porcentaje de muestras que resultaron positivos al VDC por la Prueba de RT-PCR.	31
Cuadro 6. Resultado de la amplificación del gen N para el diagnóstico de distemper canino mediante el empleo de RT-PCR	31
Cuadro 7. <i>Resultado positivos al gen N para el diagnóstico de distemper canino mediante el empleo de RT-PCR</i>	31

1. INTRODUCCIÓN

El distemper canino (DC), moquillo canino o también conocida como enfermedad de Carré, es una de las enfermedades víricas sistémicas más frecuentes y contagiosas de mayor distribución mundial; producida por un virus perteneciente a la familia *Paramoxoviridae* del género *morbilivirus*, afecta a todos los canidos pero también a muchas especies carnívoras y algunas especies acuáticas; actualmente existen reportes en suinos, roedores y también en primates no homínidos (Lamb y Park, 2007; Pinotti *et al*, 2014; Fuques, 2017)

La antigüedad y lugar de origen del virus del distemper canino (VDC) aún es un tema que está en discusión, y existen varios puntos de vista de su historia evolutiva. Según datos históricos en 1746, la enfermedad fue descrita por primera vez por Antonio de Ulloa en sus viajes a Sudamérica, se sostiene que el origen del virus fue el Perú (ver anexo 1), lugar de donde se estima emigro a Europa en el siglo XVIII (Varner, 1983; Blancou, 2004). Los primeros casos de canidos con la sintomatología del DC en Europa datan en 1760 en España, Rusia, Italia e Inglaterra (Varner, 1983; Blancou, 2004). Edwar Jenner en 1809 describe casos de perros en Inglaterra que manifestaban signos clínicos característicos del VDC; pero, se pensaba que se trataba de una enfermedad muy similar a la viruela, esta enfermedad solo estaba descrita en base a signos clínicos hasta que en 1905 fue aislada por Henri Carré (Forero 2016, Fuques, 2017).

A mediados del siglo XX, el Distemper fue considerado la enfermedad de mayor letalidad en caninos en todo el mundo, en la década de los 40' se trató de reducir los casos mediante el uso de vacunas inactivas del virus del moquillo canino (VDC) sin ningún éxito, en la década de los 60', la enfermedad estuvo bajo control gracias a la aparición de vacunas con el virus vivo modificado (Hurtado, 2017).

Actualmente la vacunación es necesaria para disminuir la presentación de casos clínicos de DC más no garantiza una protección total, puesto que, existen reportes de casos positivos en canes inmunizados (Linares *et al.*, 2010; Forero, 2016); además, cabe recalcar que la protección brindada por la vacuna es de 3 años aproximadamente, por ello se entiende que los canes deben recibir refuerzos vacunales periódicamente para no perder la protección (Soto, 2017).

El DC pese a ser una enfermedad muy estudiada, suele presentar algunas dificultades para su diagnóstico y prevención por lo cual se debe tomar en cuenta la historia clínica, los signos clínicos ya que esta enfermedad suele manifestar cuadro respiratorio o gastrointestinal inespecífico, hasta signos multisistémicos con una alta tasa de morbilidad y mortalidad que involucra el sistema nervioso central (SNC) (Linares *et al.*, 2010). Para la confirmación de la enfermedad se utilizan múltiples pruebas, siendo las pruebas moléculas las más sensibles para detectar la presencia viral (Elia *et al.*, 2006; Román, 2014). El desarrollo de técnicas moleculares ha permitido estudiar mejor a las cepas virales y su epidemiología, determinándose una gran cantidad de linajes virales presentes en diferentes regiones y que tienen diferentes comportamientos inmunológicos y que requieren vacunas de cepas homologas para tener efecto protector (Duque *et al.*, 2019) Debido a ello, el presente estudio tiene por finalidad determinar los diversos linajes del Virus del Distemper Canino presentes en Lima Metropolitana.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Etiología

El distemper canino (DC) es considerado la patología viral de mayor seriedad que afecta a la especie canina. El agente causal es el VDC; este virus pertenece al reino *Riboviria*, phylum *Negamaviricota*, subphylum *Haploviricotina*, clase *Monjiviricetes*, orden de los *Mononegavirales*, familia *Paramixoviridae*, subfamilia

Orthoparamyxovirinae, género *Morbilivirus* que también incluye al sarampión, virus de la peste bovina (Gallo *et al.*, 2007; ICTV, 2019).

2.2. Estructura del Virus del Distemper Canino

Al igual que el resto de Paramyxovirus, el VDC es un virus ARN de una única hebra, de polaridad negativa no segmentado y con un diámetro variable (150-250 nm) y aproximadamente 15.7 kb (Lamb y Parks, 2007). El genoma posee seis genes los cuales codifican seis proteínas estructurales (ver fig. 1); una proteína asociada a la Matriz (M), dos glicoproteínas; la proteína de fusión F y hemaglutinina H (glicoproteína más grande), dos proteínas cuya función consiste en la transcripción y la replicación del ARN (fosfoproteína P y la proteína polimerasa L); y por último, la proteína que se encarga de encapsular el ARN viral; nucleocápside N (Martella *et al.*, 2008).

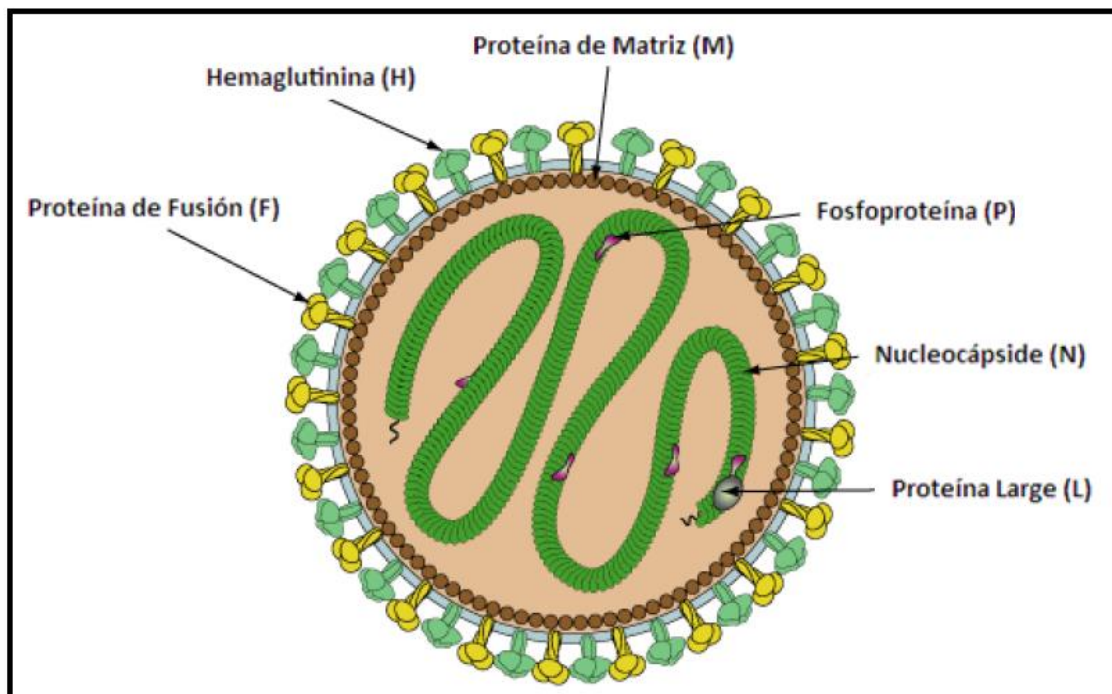


Figura 1. Representación esquemática del virión de un morbilivirus (Sarute, 2013).

La hemaglutinina (gen H) es una proteína clave para el VDC y sus hospederos. Debido a que el virus utiliza este gen para la unión de receptores en la célula en el primer paso de la infección (Martella *et al.*, 2008). Cada gen solamente codifica una proteína estructural excepto el gen P/V/C que codifica la fosfoproteína y dos proteínas no estructurales V y C (Lamb y Parks, 2007). En los extremos del ARN posee regiones no traducidas (UTR) no codificantes las cuales son denominadas *leader 3'* y *trailer 5'*, (ver fig.2) que son de suma importancia en la replicación y transcripción (Sarute, 2013).

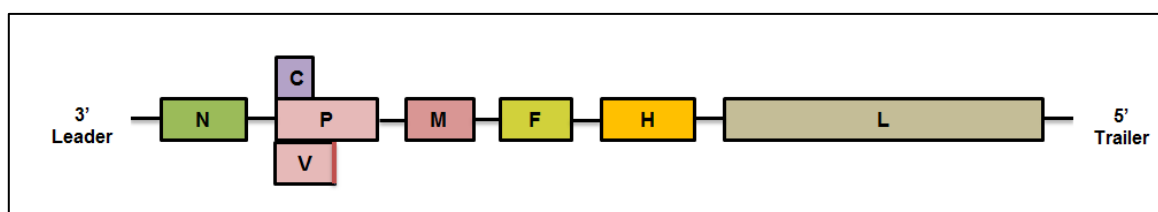


Figura 2. Representación esquemática del genoma del VDC indicando los 6 genes (N, P, M, F, H y L) que lo sintetizan las proteínas estructurales y los 2 genes (C y V) que codifican las proteínas no estructurales del virus (Sarute, 2013).

La transcripción de los genes se da por la ribonucleoproteína (RNP) gracias a un promotor simple que se localiza en la región *leader* por un mecanismo llamado Start-Stop; este mecanismo permite que la transcripción inicie en el primer gen del extremo 3' (Nucleoproteína) y que se detenga en cada región intergénica; esto se debe a que el ARN polimerasa viral puede separarse del ARN molde, provocando la interrupción del proceso (Anderson y Messling, 2008). Posteriormente; el mencionado mecanismo conlleva a una gradiente transcripcional que se encuentra presente durante todo el proceso infeccioso; por ello que los genes que se hallan cercanos al extremo 3' del genoma se transcriben en mayor cantidad a los que se encuentran cercanos al extremo 5' (figura. 3) (Sarute, 2013).

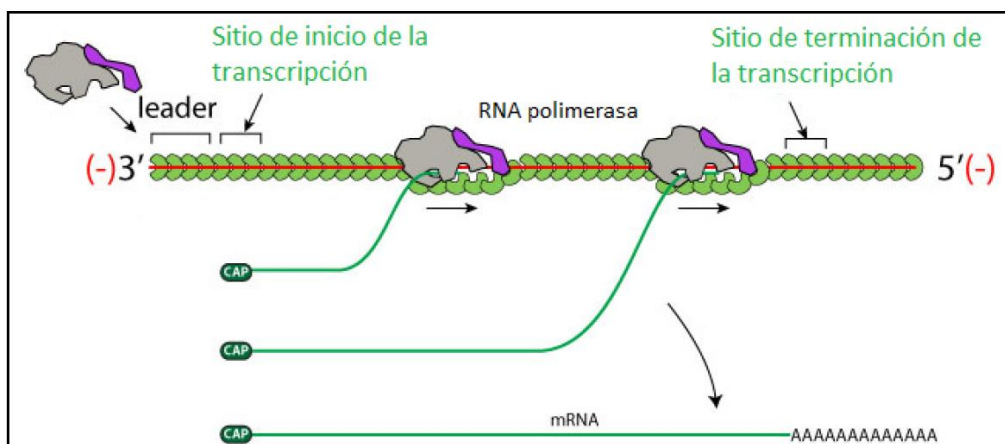


Figura 3. Mecanismo de transcripción de los morbilivirus (Sarute, 2013).

2.2.1. Proteínas virales

2.2.1.1. Nucleoproteína (N)

Está codificada por el gen N y presenta en su composición 525 aminoácidos (aa); y, también es la proteína que se encuentra en mayor cantidad del virus y es altamente inmunogénica en los Morbilivirus, desempeña un papel muy importante en la replicación del virus y en el ensamblaje del VDC (Sarute, 2013; Li *et al.*, 2018).

Este gen altamente conservado en la cadena genética del VDC y su región central es aquella que presenta la menor variación genética; una de las principales razones por la que se emplea este gen como blanco para su diagnóstico molecular; no obstante, se han demostrado por estudios que existen pequeñas variaciones del gen N entre aislados de campo (Muñoz, 2013).

2.2.1.2. Fosfoproteína (P)

Este gen se encuentra constituido por 507 aa y también es un co-factor de la polimerasa que es activada por fosforilación y junto con la proteína L sintetiza ARN mensajero como complejo RNP (Karlin, *et al.*, 2002; Vagnozzi y Carrillo, 2006;

Sarute, 2013). La fosfoproteína es un gen altamente conservado del VDC y; codifica tres proteínas distintas P, V y C; sin embargo las proteínas C y V se consideran no esenciales para la replicación (Wakasa *et al.*, 2000; Vagnozzi y Carrillo, 2006; Sugai *et al.*, 2009).

2.2.1.3. Proteína de Matriz (M)

Proteína codificada por el gen M y se encuentra constituida de 335 aa. Se encuentra ubicada por debajo de la envoltura viral e interviene con el complejo RNP por lo cual desempeña un papel muy importante en la morfología y ensamblaje del virión (Lamb y Parks. 2007; Sarute, 2013).

2.2.1.4. Proteína de Fusión (F)

Proteína codificada por el gen F; es una glicoproteína transmembrana tipo I formada por 662 aa; esta glicoproteína permite que se dé la fusión entre la envoltura viral y la membrana plasmática de la célula del hospedero; por lo tanto se puede afirmar que su participación es fundamental en el proceso infectivo (Sarute, 2013).

2.2.1.5. Proteína Hemaglutinina (H)

Es una glicoproteína transmembrana de tipo II que es codificada por el gen H y está constituida por 607 aa. Esta proteína permite que se realice la unión del virus con un receptor que se encuentra en la membrana plasmática de la célula. (Sarute, 2013; Tizzano, 2013), dicha unión desencadenará varios cambios en la proteína de fusión (F); de tal modo que, la porción hidrofóbica de la proteína se introduzca en la membrana plasmática, desencadenando la fusión de las membranas por tal motivo permite el ingreso del virus (figura. 4) (Messling *et al.*, 2001).

La hemaglutinina determina el tropismo viral *in vitro* e *in vivo*, existen varios estudios comparativos del gen H que indican que este gen está sujeto a mayor variabilidad genética cuando se compara con los otros genes que componen el VDC; por lo tanto, se podría decir que es el ideal para la identificación de linaje y de análisis genéticos; su secuencia de aminoácidos varía en 10% aproximadamente entre las diferentes cepas de DC (Paz, 2013; Espinal *et al.*, 2014).

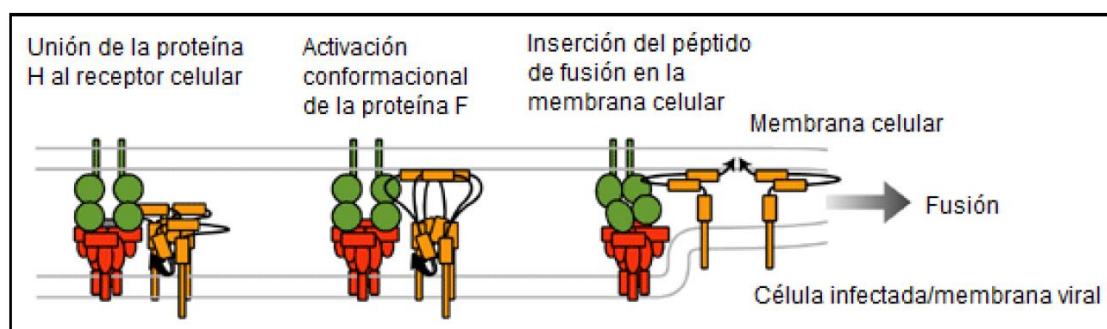


Figura 4. Mecanismo de fusión entre el virus y la célula: intervención de la hemaglutinina y la proteína de fusión (Messling *et al.*, 2001).

2.2.1.6. Proteína Larga o Polimerasa viral (L)

Codificada por el gen L, formada por 2184 aa; la polimerasa viral es también subunidad fundamental del complejo del ARN polimerasa puesto que cumple un rol catalítico en la síntesis del ARN viral, también actúa junto a la fosfoproteína P y forma el complejo activo de la polimerasa y es constituyente integral de la nucleocápside (figura 1) (Sarute, 2013).

2.3. Hospederos

Los morbilivirus se caracterizan por causar enfermedades gastrointestinales, inmunosupresoras, respiratorias y/o neurológicas desde signos moderados a severos en un gran número de huéspedes (Lamb y Park, 2013). El distemper canino

es una enfermedad endémica en todas las regiones del mundo que presenta una alta morbilidad y mortalidad (Paz, 2013). Muchos estudios han demostrado que en la actualidad existe una amplia gama de carnívoros terrestres; en especial, miembros de la familia Canidae que son muy susceptibles a la infección natural (perro, perro salvaje, perro australiano, zorro, coyote, lobo y chacal, entre otros) y la familia Mustelidae (comadreja, hurón, visón, zorrillo, tejón, armiño, marta y nutria, entre otros); también, existen reportes en primates no homínidos, roedores y suinos (Fuques, 2017; Rendón *et al.*, 2019). Una de las características más resaltantes de esta enfermedad es que altamente patógena y suele afectar con mucha frecuencia a cachorros de cuatro a seis meses de edad; (grupo etario de mayor susceptibilidad); aunque, pueden ser susceptibles caninos de cualquier edad (Pinotti, 2011).

Recientemente, los brotes de moquillo se han intensificado en perros y en un número cada vez mayor en las especies carnívoras, por ello es objeto de muchos estudios para dilucidar las posibles mutaciones y mecanismos virales que pueden estar implicados en la susceptibilidad del hospedero (Ferreira *et al.*, 2016).

Existen reportes de un incremento en la gama de huéspedes del VDC, recientemente se informó que este virus causó los signos neurológicos observados en un oso hormiguero amazónico (*Tamandua tetradactyla*) en cautiverio (Lunardi *et al.*, 2018).

2.4. Transmisión y diseminación

La transmisión del VDC se da por contacto directo a los aerosoles y/o secreciones oculares, orina y heces de animales infectados; puesto que este virus no es estable en el condiciones ambientales (Paz, 2013; Soto, 2017). La eliminación del virus en un paciente enfermo se da 7 días post infección y se puede diseminar

por un laxo de 60 a 90 días, aunque el periodo de eliminación es generalmente menor. (Buña, 2019)

2.5. Susceptibilidad y factores de riesgo

Los canidos jóvenes son la edad etaria más susceptible en comparación a cánidos adultos a la infección de VDC mostrándose una alta susceptibilidad dentro de los cuatro a seis meses de edad, cuando ya se ha perdido los anticuerpos maternos (Salas, 2013). Existen múltiples factores que pueden permitir la infección por el virus de distemper canino tanto en animales no inmunizados como inmunizados.

En animales vacunados; uno de los factores es la falta de conocimiento sobre la diversidad de linajes del virus presente en nuestro país; puesto que la existencia de dicha diversidad genotípica representada por linajes que evaden la respuesta inmune vacunal ya fue demostrada y es objeto de múltiples estudios en todo el mundo. (Forero, 2016).

2.6 Epidemiología

Esta patología es altamente prevalente; presentando también una elevada morbilidad y mortalidad; la morbilidad varía desde un 25% hasta 75% y puede causar una mortalidad de 50% al 90% esto dependiendo de la cepa del virus actuante (Soto, 2017).

Los autores indican que no hay diferencias acerca sobre el predominio de la enfermedad con respecto al sexo del animal; sin embargo; la raza cumple un papel importante en la transmisión de la enfermedad puesto que se documenta una mayor incidencia en animales mestizos y en cuanto a la estación del año indican que la mayor incidencia de los signos clínicos es en meses de inviernos (Pinotti *et al.*, 2012).

2.7. Diversidad genética

En las últimas décadas, se han reportado varios brotes de distemper canino en perros vacunados adecuadamente en diferentes regiones del mundo; estos brotes pueden ser consecuencia de la aparición de nuevas estirpes (cepas) de campo capaces de evitar la respuesta inmune generada por las “cepas conocidas” que se utilizan actualmente en las vacunas y / o debido a la capacidad de las nuevas cepas de campo para infectar otros hospederos carnívoros. (Sarute *et al.*, 2013).

En la actualidad las tasas de mutación del VDC se han asociado principalmente a la susceptibilidad de su genoma (ARN) para producir cambios debido a la tasa de error de su ARN-polimerasa viral (Rendón *et al.*, 2019). A pesar de la gran variedad genética que presenta este virus, hay estudios que demuestran que existe una alta conservación en las proteínas P, N, L y M ; posiblemente atribuido a la importancia que presentan estas proteínas en la transcripción y replicación viral (Lauring y Andino, 2010).

El gen H del VDC es uno de los que posee mayor variación en comparación a otros genes del virus, por lo que no es la mejor elección para diagnóstico de la enfermedad; pero, juega un papel muy importante para poder conocer el linaje del virus circulante (Rios y Rocio, 2015). Los linajes se definen por la variabilidad que presenta la secuenciación completa la hemaglutinina; pero esta amplificación suele ser un tanto complicada debido a su tamaño que es de 1824 pb. (Messling *et al.*, 2001; Martella *et al.*, 2008; Soto, 2017).

El gen que codifica la proteína H es el más variable dentro del género Morbilivirus 10% en comparación de la proteína de fusión 4%; por tal motivo la hemaglutinina es ampliamente usado para poder analizar los cambios genéticos entre las estirpes de VDC. (Messling *et al.*, 2001). Para denominar a una cepa dentro de un mismo linaje o genotipo debe presentar un porcentaje de identidad de

aminoácidos $\geq 96.5\%$ para considerarlo del mismo genotipo bajo este criterio se identificaron las nuevas cepas del VDC (Martella *et al.*, 2006, Duque *et al.*, 2019); entonces, para hablar de la variabilidad genética del VDC se debe expresar particularmente el gen de la hemaglutinina ya que esta proteína determina el tropismo celular y la gama de huéspedes debido a la capacidad de ligación con los receptores SLAM en los tejidos linfoides y Nectin-4 en tejidos epiteliales. Los estudios actuales han clasificado los linajes circulantes en 19: América 1 (cepas de la vacuna), América 2, América 3, América 4, América 5 Arctic- like, Rockborn like, Asia 1, Asia 2, Asia 3, Asia 4, Asia 5, África 1, África 2, European Wildlife, Europa / Sudamérica del 1, Sudamérica 2, Sudamérica 3 y Sudamerica 4 (Duque *et al.*, 2019; Bhatt *et al.*, 2019).

2.8. Patogénesis

Los perros jóvenes son grupo etario más afectado por el VDC, mostrando mayor índice de susceptibilidad cuando los cachorros han perdido los anticuerpos maternos (de cuatro a seis semanas de vida) (Murphy *et al.*, 1999).

La transmisión del VDC se da principalmente por medio de secreciones respiratorias, aerosoles y fómites a través de estas vías alcanza las mucosas donde se da la primera interacción con el sistema inmune del hospedero por la infección temprana de células mononucleares CD150⁺ y de linfocitos locales (Messling *et al.*, 2005). Posteriormente; el virus, desarrolla varios mecanismos para neutralizar y evitar la respuesta inmune innata y adaptativa; inicialmente se aprovecha de las células del sistema inmune y las utiliza como vehículo de transporte a los nódulos linfáticos regionales; luego se da la replicación deletérea en las subpoblaciones de linfocitos entre los tres primeros días postinfección (PI), luego se establece viremia que es asociada a leucocitos generándose una elevada replicación en órganos linfoides con agotamiento selectivo de la subpoblación Th1 y para el séptimo día PI ya se trata de un cuadro sistémico (Messling *et al.*, 2004).

La hemaglutinina del virus es la encargada de la infección de linfocitos; esta glicoproteína de la envoltura lipídica que se une al receptor linfocitario CD150/ SLAM (*Signaling Lymphocyte Activation Molecule*) (Cespedes *et al.*, 2010). El receptor

CD150 tiende a expresarse de manera diferencial en distintos grupos celulares, que forma parte de células hematopoyéticas lo que explica la afinidad a los linfocitos (Messling *et al.*, 2003).

Cuando el virus infecta a las células inmunes asegura la síntesis del ARN_m y la replicación formando el complejo ribonucleoproteico (RNP), logrando evitar el reconocimiento del TLR-3 (TollLike Receptor - 3) e inhibe las vías de activación del factor de transcripción NF-KB (Nuclear Factor – Kappa B) que es el responsable de la presencia de citoquinas proinflamatorias, moléculas de adhesión y receptores inmunológicos (Soto, 2017).

Por esta causa se da la severa leucopenia descrita entre los primeros días postinfección, dándose una disminución hasta el 80% de linfocitos y monocitos también de un 40% a 60% de linfocitos T y B infectados (Rudd *et al.*, 2006). Son pocos los monocitos / macrófagos que expresan los antígenos virales lo que se relaciona directamente con la limitada expresión de CD150 (Soto, 2017). La rápida multiplicación del virus en los órganos linfoides da como resultado un alza de la temperatura corporal que coincide con la presentación del interferón circulante (Céspedes *et al.*, 2010). El estado febril y la disminución de linfocitos suelen ser imperceptibles; la fiebre suele disminuir durante varios días hasta que se da una segunda fase febril (por ello el nombre distemper), que es donde se muestran altos títulos virales y da el inicio a cuadro clínico en donde el paciente suele presentar rinitis, conjuntivitis y anorexia (Soto, 2017).

El cuadro multisistémico junto a la viremia secundaria son etapas de mucha importancia para que el virus junto a células mononucleares y endoteliales infectadas pueda alcanzar al sistema nervioso central (SNC) (figura 5), al octavo día PI (Craig y Sykes, 2000), a través del plexo coroideo, produciendo la dispersión epiteliopatrónica que es característica de la fase tardía de la infección donde los signos clínicos son impredecibles (Appel y Summers. 1999). Hay otras vías de ingreso viral como puede darse la infección de neuronas receptoras y la invasión de

la mucosa respiratoria, donde por sinapsis neuronal alcanza nervio y bulbo olfatorio; donde, comienza el proceso patológico diseminándose después al resto del SNC (Rudd *et al.*, 2006).

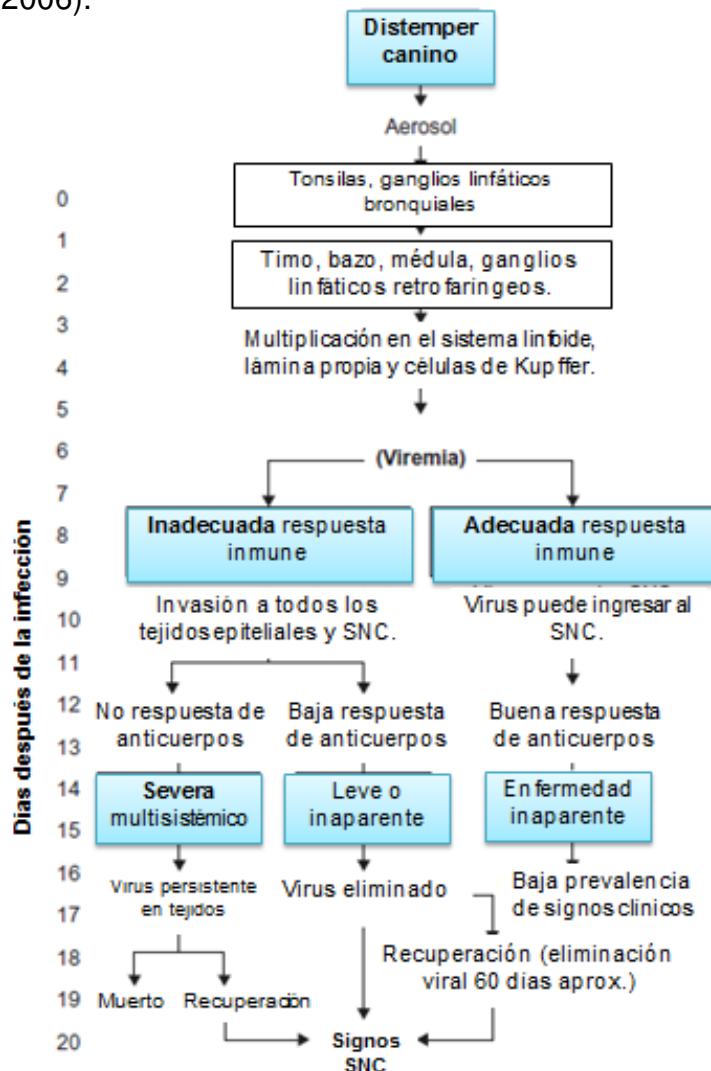


Figura 5. Secuencia de la patogenicidad del virus del distemper canino al Sistema Nervioso Central (Greene y Apple, 2006).

La respuesta humoral y celular inicia entre el noveno y décimo cuarto día PI (Soto.2017); si se da una respuesta adecuada y los anticuerpos neutralizantes se sintetizan de manera efectiva, alcanza niveles adecuados (títulos mayores 1:100), el virus no se propaga; es eliminado, mostrando signos clínicos leves (Céspedes *et al.*, 2010). La IgG es el anticuerpo específico contra el VDC pues lo logra neutralizar

extracelularmente e inhibe su diseminación intracelular (Soto.2017, Craig y Sykes, 2000).

Cuando la respuesta es tardía o débil (anticuerpos neutralizantes menores a 1:1000), el VDC invade todo el organismo (células epiteliales respiratorias, piel, epitelio del sistema respiratorio, gastrointestinal y genitourinario), posteriormente se puede dar la recuperación completa o empezar a mostrar los signos clínicos del SNC (Nelson y Couto. 2010). El virus suele eliminarse de la mayor parte de los tejidos del cuerpo a medida que van aumentando los títulos de anticuerpo; pero, cabe la posibilidad de que pueda persistir por largos periodos como virus completo en tejido uveal, neuronas y en tegumentos de almohadillas plantares (Craig y Sykes, 2000), la recuperación otorga inmunidad prolongada y finaliza con la eliminación del virus (Soto, 2017).

Cuando han transcurrido alrededor de veintiocho días PI, el virus libre hace presencia en el fluido cerebroespinal, lo cual explica la elevada cantidad de focos de desmielinización que se encuentran ubicados bajo la piamadre en capas subyacentes del cuarto ventrículo, la corteza cerebral y cerebelar (Céspedes *et al.*, 2010).

2.9. Cuadro clínico

En las especies susceptibles, comúnmente, la enfermedad es sistémica presentando signos clínicos digestivos, respiratorios y nerviosos (Soto, 2017), los cuales podrían variar dependiendo las condiciones ambientales, edad del animal, inmunidad del huésped, virulencia de las cepas (Craig y Sykes, 2000, Sarute, 2013); las cuales determinan la letalidad o no de la enfermedad, que por lo general se da entre la primera y segunda semana post infección (Greene y Appel, 1998). El mayoría de infecciones en caninos domésticos (70%) presentan el cuadro subclínico, en estos casos la enfermedad suele manifestarse, el de forma leve causando inapetencia, fiebre e infección en el tracto respiratorio superior; pero, cabe

destacar que el cuadro agudo de la enfermedad causa una alta tasa de mortalidad, estos animales presentan signos clínicos asociados al sistema respiratorio y digestivo los cuales incluyen descargas óculo-nasales, disnea, tos, conjuntivitis, neumonía, diarrea, vómitos, deshidratación severa (Sarute, 2013, Martella *et al.*, 2008).

Cuando el perro logra desarrollar una respuesta inmune elevada, el virus se puede eliminar de los tejidos y el animal se recupera favorablemente de la infección, en casos en los que el sistema inmune desarrollo una respuesta débil, el virus llega a los tejidos epiteliales y en casos más severos al sistema nervioso central (SNC) (Martella *et al.*, 2008). Los signos clínicos iniciales pueden desaparecer; pero, el virus puede permanecer por tiempos prolongados en el urotelio, neuronas, úvea, almohadillas plantares, se observa hiperqueratosis y los signos del SNC se ven retrasados, cuando no se logra desarrollar una respuesta inmune el virus sigue replicándose y se distribuye por todo el cuerpo (Martella *et al.*, 2008). Cuando el virus se localiza en el SNC da como resultado una desmielinización aguda (Appel *et al.*, 1984), los signos clínicos suelen agravarse por infecciones bacterianas secundarias y los signos dermatológicos pueden ocurrir 10 días PI; otros de los signos típicos de la enfermedad son la hipoplasia del esmalte e hiperqueratosis de la nariz y almohadillas (Anexo 2) plantares signos que pueden ser observados en perros que se recuperan de la infección subaguda (Martella *et al.*, 2008).

La severidad de la infección es la que determina la manifestación total o nula de los signos neurológicos, después de la recuperación de la enfermedad los daños neurológicos pueden tardar en presentarse semanas o hasta meses (Nelson y Couto, 2010).

2.10. Diagnóstico

2.10.1. Diagnóstico Clínico presuntivo.

La infección por la enfermedad causa en el animal afectado secreciones óculo-nasales, anorexia, hiperqueratosis, diarreas, convulsiones; sin embargo, como se puede evidenciar, el DC es una enfermedad que presenta una variedad de signos clínicos los cuales también son similares a otras enfermedades, tales como los de la perrera (etapa temprana), parainfluenza canina, adenovirus canino tipo 2, etc; por lo cual se han desarrollado diversas técnicas para obtener el diagnóstico de la enfermedad de manera más precisa y confiable (Demeter *et al.* 2007, Fuques, 2017).

2.10.2. Ensayos serológicos.

Existen técnicas basadas en ensayos inmunológico y serológicos para el diagnóstico del DC: ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), inmunocromatografía rápida, test de fluorescencia indirecta de anticuerpos (IFAT) y sero-neutralización (Fuques, 2017).

Estos tipos de ensayos son muy utilizados en clínicas veterinarias como técnicas para diagnóstico rápido de DC (ver anexo 3); la presencia de estos anticuerpos no siempre indica que el animal esté infectado al momento de la toma de muestra, sino que pudo estar en contacto con el patógeno en algún momento; sin embargo, estos ensayos suelen presentar falsos negativos y no distinguen entre una cepa viral salvaje, reversión de vacunación con virus vivo modificado, o presencia de especies recombinantes entre vacunas y cepas salvajes (Martínez y Ruiz, 2016).

2.10.3. Aislamiento Viral.

El VDC es detectado mediante el aislamiento de las partículas virales mediante el cultivo de linfocitos de los alveolos pulmonares, co-cultivos de tejidos infectados con linfocitos derivados de perros sanos (Appel *et al.*, 1991, Craig y Sykes, 2000). En el 2001 se diseñaron células Vero a partir de células epiteliales de riñón de mono, que expresan el receptor SLAM obteniendo un linaje celular específico para el aislamiento del virus.

2.10.4. Reacción de transcripción inversa en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método enzimático *in vitro* que permite la síntesis de millones de copias de un fragmento específico del ADN, tiene una alta sensibilidad y especificidad lo cual ha hecho de esta metodología una herramienta que innovo el análisis y manipulación del material genético (Pedrosa, 1999).

La Reacción de Transcripción Inversa en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR); variante de la PCR; es empleada para detectar la expresión de niveles de ARN y genes desde la reacción de ADN Complementario (ADNc) empleando la transcriptasa inversa (Soto, 2017). El ADNc se amplificará utilizando una PCR tradicional (Gebara *et al.*, 2004). El genoma del VDC ha sido detectado mediante RT-PCR en muestras de suero, sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR) y orina (Saito, 2006).

El empleo de RT-PCR para el diagnóstico del VDC es muy sensible, pero su sensibilidad puede variar dependiendo de la muestra, del método de extracción del ARN viral y también la elección de cebadores. Las muestras que se pueden utilizar son suero, líquido cefalorraquídeo (LCR), heces y orina. Se pudo comprobar con el

estudio realizado en 2006 que la técnica de diagnóstico en orina es más sensible que el suero, tan sensible como el LCR en la fase nerviosa del distemper (Saito, 2006).

En un estudio previo se detectó el virus de la vacuna en la orina como máximo al segundo día post vacunación, pero un periodo más prolongado y con mayor frecuencia en las heces, saliva, lágrimas y secreciones nasales. Por lo tanto la vacunación no complicaría el diagnóstico mediante la detección del virus en la orina. (Saito, 2006).

2.11. Tratamiento

El DC, por ser una enfermedad viral que afecta múltiples órganos y sistemas, no existe tratamiento específico sólo tratamiento de soporte; teniendo en cuenta que cada caso es particular (Pinotti *et al.*, 2012). Se debe controlar las infecciones bacterianas secundarias y se sugiere tratar los signos clínicos que se presentan en la enfermedad; la terapéutica más empleada consiste en el uso de antibióticos puesto que regularmente los cuadros neumónicos se ven complicados por infecciones bacterianas secundarias; siendo uno de los antibióticos de elección, la amoxicilina-clavulánico (Pinotti *et al.*, 2011). Fluidoterapia con el uso de electrolitos balanceados por vía intravenosa; siempre y cuando haya casos de vómitos, diarreas y anorexia, Vitaminas del complejo B con el propósito de estimular el apetito; se mencionan el uso beneficioso de ácido ascórbico, aunque no se ha corroborado su eficacia.

El uso de antipiréticos es empleado en cuadros febriles con temperaturas iguales o mayores a 40°C; cuando hay fase nerviosa la medicación es con anticonvulsivos y sedantes, Cabe recalcar que los trastornos neurológicos no tiene resultados gratificantes pues la encefalitis multifocal es progresiva y conduce a la incapacitación, por lo que se debería recomendar la eutanasia (Pinotti *et al.*, 2014).

2.12. Prevención y control

El método más recomendado es la vacunación (Ettinger y Feldman, 2010). Los cachorros reciben anticuerpos maternos contra el DC gracias al calostro que es alrededor del 97% y 3% por el útero. Cuando un cachorro no ingiere calostro está protegido por un periodo máximo de 4 semanas; los anticuerpos disminuyen hacia las 12 semanas de vida (Del Puerto *et al.*, 2010). Es recomendado por la Asociación Americana de Hospitales Animales vacunar contra el VDC entre las 6 y 16 semanas de vida de los cachorros con un intervalo de 3 o 4 semanas en perros que han mamado calostro (Ettinger y Feldman, 2010); para perros que no tomaron calostro o perros mayores a 16 semanas, que no han iniciado un cronograma de vacunación, es recomendable administrar por lo menos 2 vacunas con intervalos de 2-4 semanas (Del Puerto *et al.*, 2010). No tiene efecto beneficioso vacunar animales ya expuestos por tener un bajo o nulo resultado (Barengo *et al.*, 2018).

Las vacunas que poseen el virus entero ha demostrado ser no muy efectiva para la protección (Barengo *et al.*, 2018); sin embargo, las vacunas vivas modificadas brindan una mayor protección contra la infección dando una duración de inmunidad de al menos 3 años (Ettinger y Feldman, 2010). Estas vacunas contra el DC provocan una respuesta inmune de tipo humoral y mediada por célula.

Muchos autores sugieren que, en lugar realizar la revacunación anual de los canes domésticos, podría evaluarse los niveles de anticuerpo en bases regulares, y aquellas mascotas que presenten niveles bajos o nulos de anticuerpos, deben ser revacunados (Warner *et al.*, 2006).

Existe una gran desventaja con el uso de vacunas vivas modificadas, pues para brindar una mayor protección, es necesario utilizar cepas más agresivas; para lo cual no es satisfactorio utilizar estas vacunas en animales que se encuentren inmunosuprimidos; ya que, estos animales podrían presentar la enfermedad

(Greene y Apple 1998). Una de las reacciones más frecuentes es la encefalitis post vacunal, entre los 7 a 14 días post vacunación, presentando signos neurológicos variables (Barengo *et al.*, 2018); pero, la presentación de signos clínicos compatibles con el distemper canino después de la vacunación puede que se deba a la infección previa al momento de la vacunación (Greene y Apple ,1998).

La presentación de la enfermedad en perros inmunizados se suele atribuir a la inapropiada conservación de la vacuna, al empleo incorrecto de programas de vacunación o el estado sanitario e inmunológico del cánido (Figura 6) (Sarute.2013; Ettinger y Felmand, 2010). Cuando existe historia clínica de vacunación se recomienda realizar la medición de anticuerpos protectores específicos con el VDC (Greene y Apple ,1998).

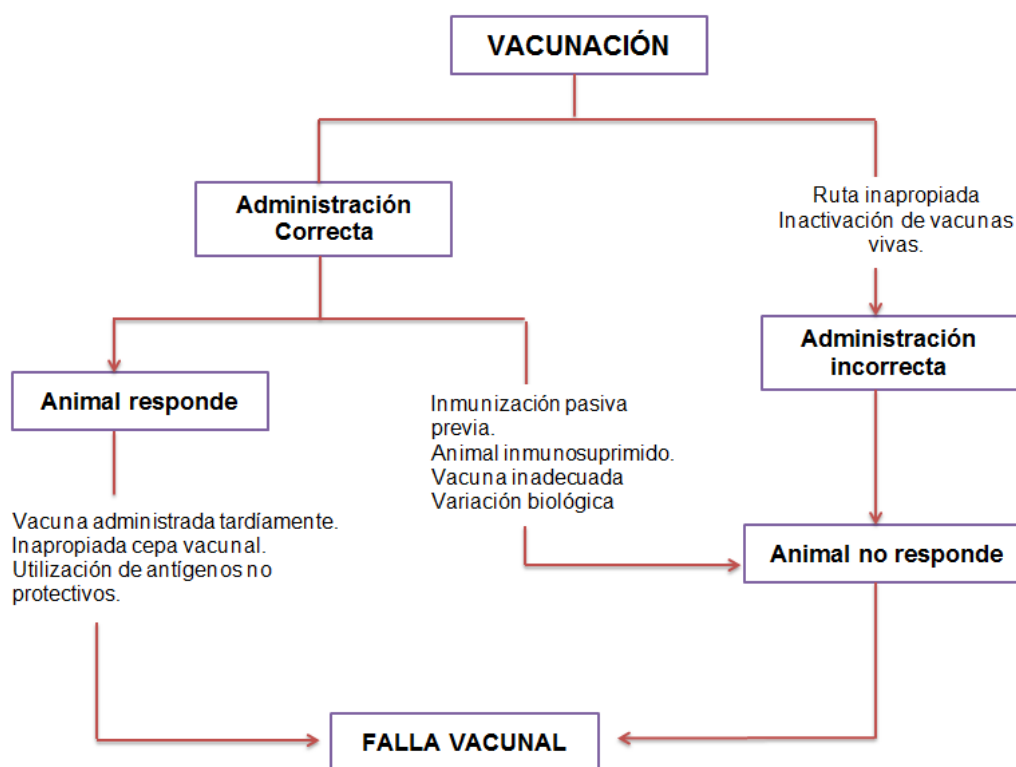


Figura 6. Razones asociadas a fallas en la vacunación (Sarute, 2013)

El virus del DC es susceptible a la luz ultravioleta; aunque es protegido de la inactivación gracias a las proteínas y antioxidantes que lo rodean, es

extremadamente susceptible al calor, se destruye a temperaturas entre 50°C y 60°C durante 30 minutos (Greene y Apple ,1998).

En tejidos y secreciones puede sobrevivir a 37°C por una hora y un máximo de 3 horas a 20°C; y, a temperaturas de 0 a 4°C sobrevive por semanas (Barengo *et al.*, 2018).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

La primera parte del proyecto se realizó en la Clínica veterinaria de animales menores de la Facultad de Medicina Veterinaria de la universidad Mayor de San Marcos (FMV – UNMSM), en donde se aplicó un muestreo por conveniencia donde el factor de inclusión fueron todos canes que presenten diagnóstico clínico presuntivo de distemper canino (DC) por médicos veterinarios de la Clínica veterinaria; no se tomó en cuenta la edad, sexo ni raza (cuadro 1), de los pacientes con el diagnóstico clínico de DC se tomó una muestra de orina para la detección del ARN viral del virus ; estas muestras fueron remitidas refrigeradas para su procesamiento al Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria Sección de Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.2. Toma y procesamiento de muestras

3.2.1. Información de los individuos de estudio.

El perro debe cumplir con el criterio de inclusión inicial para realizar el muestreo (diagnóstico clínico presuntivo a distemper canino), fiebre, conjuntivitis, hiperqueratosis nasal y plantar, hipoplasia del esmalte, depresión, secreción

mucopurulenta, tos, disnea, diarreas, parálisis del tren posterior, tic nervioso y/o convulsiones; sin embargo, no es necesario con que el paciente presente todos los signos clínicos para tener sospecha del distemper canino.

3.2.2. Tamaño muestral

Se colectaron 36 muestras de orina de cánidos con signos compatibles con la enfermedad de distemper canino (Signos respiratorios, digestivos, nervioso, cuadro febril, depresión inapetencia) que se presentaron a la Clínica de Animales Menores de la facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, durante el periodo de agosto del 2018 y diciembre del 2019.

Cuadro 1. Signos presentes en los perros muestreados. SR: Signo respiratorio, SGI: Signo gastrointestinal, SN: signo nervioso, Conj: Signo ocular, Dx: (Diagnóstico).

Muestra	Sexo	SR	SGI	Conj	SN	DX. RT-PCR
1	M	+	-	-	+	+
2	M	-	±	-	-	-
3	M	+	-	-	-	+
4	M	-	-	+	+	+
5	H	-	-	-	±	-
6	H	-	-	-	+	+
7	M	-	±	-	-	-
8	M	-	-	-	+	-
9	M	-	-	-	+	-
10	H	±	-	-	-	-
11	M	-	-	-	±	+
12	H	-	±	-	-	+
13	H	±	-	-	-	-
14	H	-	-	-	±	-

15	M	-	±	-	-	-
16	H	-	-	-	+	-
17	M	±	-	-	-	-
18	M	±	±	-	-	+
19	M	-	-	-	±	-
20	H	±	-	-	-	-
21	M	-	-	-	±	-
22	M	-	-	-	+	-
23	H	-	±	-	-	+
24	H	-	-	-	-	-
25	H	-	+	-	+	+
26	H	+	-	+	+	+
27	M	±	±	-	-	-
28	H	+	+	-	-	+
29	H	-	-	-	+	+
30	H	-	+	-	+	-
31	M	+	+	+	-	+
32	H	-	+	-	+	+
33	H	-	-	-	+	-
34	M	-	-	+	+	-
35	M	-	±	-	-	-
36	H	-	-	-	+	+

3.2.3. Colección de muestras

Se extrajo aproximadamente 2 ml de orina como mínimo de cada animal por; micción espontánea, el uso de sondas urinarias y/o cistocentesis en frascos estériles. Las muestras fueron llevadas al laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria Sección de Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM para ser centrifugadas y obtener un pellet de células

sedimentadas, estas células deben ser congeladas a -20°C hasta el momento de su procesamiento (Fischer *et al.*, 2013).

3.2.4. Extracción de ARN viral

El ARN viral fue extraído de los pellet de células centrifugadas (muestras congeladas), también, se extrajo el ARN viral de dos marcas de vacunas comerciales que se expenden en Lima metropolitana para emplearlos como control positivo, se utilizó Trizol® LS (Invitrogen USA) para la extracción de ARN genómico de nuestras muestras siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Se tomó 300 µl de la muestra y se depositó en un vial de 1.5 ml luego se añadió 900 µl de Trizol® LS (tiocinato de guanidina + fenol). Seguidamente cada vial fue homogenizado por reiteradas veces para después ser incubados por 5 minutos a temperatura ambiente, pasado este tiempo se adicionó 240 µl de cloroformo a cada vial para ser llevado al vortex, y puesto a incubar por 5 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifugó a 12000xg por 15 minutos a 4°C., cumplido este tiempo se pudo observar la separación de tres fases en el vial de las cuales se tomó la fase superior acuosa que contiene el ARN genómico el cual fue transferido a un nuevo vial de 1.5 ml, el siguiente paso fue adicionar 600 µl de alcohol isopropílico y vorteadado para incubar en hielo por 10 minutos. Cumplido este tiempo se centrifugó por 10 minutos a 12000 xg a 4°C que produjo la precipitación de ARN genómico. Se descartó el sobrenadante (quedó un pellet) se adicionó 1 ml de etanol al 75%, se llevó a vortex y centrifugó por 5 minutos a 12000xg a 4°C. Culminado el centrifugado, se eliminó el sobrenadante y dejó secar el pellet al medio ambiente por 10 minutos. Como paso final se resuspendió el ARN con 30 µl de agua libre de nucleasas y fue encubado por 15 minutos a 60°C. Se guardó producto final a -70°C hasta la utilización, cabe resaltar que se cuantifico el ARN obtenido de las muestras para verificar que todos los tubos tenían el material genómico necesario para realizar la RT-PCR.

3.2.5. Identificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT- PCR)

1) Detección del virus del Distemper canino

Se buscó la presencia del virus del distemper canino a partir del ARN obtenido de las muestras de orina por ello se realizó:

a) Transcripción reversa (RT)

Se empleó esta técnica para transformar ARN genómico a ADN complementario (cADN), con el producto obtenido se pudo realizar la PCR para la amplificación el gen del virus que se requiere estudiar. Para la RT randómica, se utilizó kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, USA) siguiendo el protocolo del fabricante. Cabe mencionar que se sometió a la RT a todas las muestras colectadas y a dos controles positivos del virus (dos vacunas vivas modificadas de marcas diferentes que utilizan la cepa Onderstepoort del Linaje AMERICA 1).

Para la síntesis del ADN_c, se colocó 5 µl del ARN ya extraído en un tubo de PCR luego se incubó a 97°C por 5 minutos, luego se procedio a incubar el ARN a 4°C por 1 minuto, paralelamente se preparó la mistura del RT como se describe a continuación (por cada reacción): 0.6 µl de agua libre de nucleasas; 0,5 µL de la mistura de desoxinucleotidos trifosfatados [dNTP] (conteniendo 10 mM de desoxiadenosina trifosfato [dATP], desoxitimina trifosfato [dTTP], desoxicitidina trifosfato [dCTP] y desoxiguanosina trifosfato [dGTP]; concentración final 10 mM); 2 µL de tampón de enzima a 5X; 1.2 µL de solución de cloruro de magnesio (25 mM); 0.4 µL del “Cebador random hexadeoxynucleotides” (hexámeros al azar) y 0.3 µL de la enzima transcriptasa reversa. Adicionar 5 µl de este master mix a cada tubo de PCR que contiene el ARN extraído de cada muestra. A continuación se coloca las reacciones al termociclador donde es sometido al siguiente ciclo: hibridación a

25°C por 5 minutos, transcripción reversa a 42°C por 45 minutos y el estocado a 4°C hasta retirar los tubos del termociclador.

b) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación del gen de la Nucleocápside (N)

A partir del cADN se realizó la PCR para amplificar exponencialmente un fragmento altamente conservado del gen N presente en todos los linajes reportados del virus de distemper canino. El master mix de la reacción se realizará utilizando el kit GoTaq Flexi Green (Promega, Madison, USA). Se emplearon los siguientes cebadores (cuadro 2.) que se alinearán a una región conservada de la nucleocápside viral (N) (Frisk *et al.*, 1999, Soto, 2017).

Cuadro 2. secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de la Nucleoproteína (Si *et al.*, 2010; Soto, 2017).

Gen	Cebadores	Secuencia	T°.m (C°)	Tamaño	Ubicación
Nucleoproteína	CVD1 Forward	5'ACA GGA TTG CTG AGG ACC TAT 3'	55.4	287 pb	769 pb a los 1055pb
	CVD2 Reverse	5' CAA GAT AAC CAT GTA CGG TGC 3'	53.7		

Se colocó 5 µL del ADNc obtenido en un tubo de PCR y se adicionó 20 µL de la siguiente mistura: 6.5 µL de agua libre de nucleasas, 12.5 µL de Master mix Green (dNTP 200 µM, MgCl₂ 3,0 mM), 0.5 µL del cebador Forward CDV1 (20 µM) y 0.5 µL del cebador Reverso CDV2 (20 µM).

Las temperaturas y ciclos empleados en el termociclador fueron: 95°C por 3 minutos para luego ser aplicados 40 ciclos consistentes en 94°C por 1 minuto, 55°C

por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, culminado el número de ciclos ingresara a una última fase de 72°C por 7 minutos.

Visualización de resultados de Reacción en Cadena de la Polimerasa

Preparación tampón TBE:

Para la preparación de un litro de TBE 0.5X (Tris Borato y EDTA) se debe diluir 50ml de TBE en 950ml de agua destilada luego homogenizar.

Preparación de gel de agarosa 1.5%:

Para que los productos del RT-PCR sean revelados con el equipo de electroforesis; se necesita un gel de agarosa al 5%. Para su preparación se utilizó 1.5 g de agarosa con 100 ml de tampón TBE, se llevó a calentar hasta que desaparezcan los cristales, se dejó enfriar un poco y se le añade 5ul de bromuro de etidio y se vierte sobre la bandeja molde junto al peine; reposar hasta que tome consistencia de gel.

Revelado en electroforesis:

Se añade 5 µL del producto del PCR en el Gel y se emplea del equipo de electroforesis que fue configurado a 120 Voltios (V) por 60 minutos. El tamaño del fragmento amplificado se estimó por comparación con un patrón de tamaño molecular 267 pb (Promega).

Reacción en cadena de la polimerasa para amplificación de la Hemaglutinina

Las muestras positivas a VDC por RT-PCR fueron sometidas a una segunda PCR con el objetivo de amplificar una región hipervariable parcial del gen H (hemaglutinina). Cuadro 3.

Cuadro 3. Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de la Hemaglutinina. Pb*= pares de bases (Si *et al.*, 2010).

Gen	Cebadores	Secuencia	T°.m (C°)	Tamaño
Hemaglutinina	Forward P5 New	5' GGT TTT ATA AAA GAT TCA AT 3'	41	768 pb*
	Reverse P6	5' GGG ATT TGA ACG GTT ACT GAG 3'	53.8	

Se colocó 5 µL del ADNc obtenido de las muestras que salieron positivas al gen de la nucleocápside y agregó 20 µL de la siguiente mistura: 6.5 µL de agua libre de nucleasas, 12.5 µL de Master mix Green (dNTP 200 µM, MgCl₂ 3,0 mM), 0.5 µL del cebador Forward P5 new (20 µM) y 0.5 µL del cebador Reverso P6 (20 µM).

Las temperaturas y ciclos empleadas en el termociclador fueron: 95°C por 5 minutos para luego ser aplicados 40 ciclos consistentes en 94°C por 50 segundos, 42°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, culminado el número de ciclos ingresó a una última fase de 72°C por 5 minutos.

Revelado en electroforesis:

Se agrega 5 µL del producto del PCR en el Gel de agarosa al 1.5% en una cámara de electroforesis con 120 Voltios (V) por 60 minutos. Se espera observar como resultado una banda fluorescente de 768 pb. En el gel expuesto en un transiluminador de luz UV.

Secuenciamiento de los productos amplificados

Los productos amplificados del gen H fueron sometidos al secuenciamiento de bases utilizando los cebadores de las reacciones de RT y PCR descrito en el cuadro 3 por el método de Sanger automático. Esta etapa del trabajo fue realizado por la reconocida Plataforma de secuenciamiento genómico MacroGen Inc. (Seúl, Corea).

También se realizó la amplificación completa del gen H utilizando los cebadores P5.1 (5' CCA ATT CAT CCA AGC TGT CC 3') Y P6 (5' GGGATTTGAACGGTTACATGAG 3') para la obtención de la secuencia completa gen con un tamaño de 1824 pb. (Cuadro 4) (Si *et al.*, 2010).

Cuadro 4. Secuencia de cebadores utilizados para la amplificación de la Hemaglutinina. Pb*= pares de bases (Si *et al.*, 2010).

Gen	Cebadores	Secuencia	Tamaño
Hemaglutinina	Forward P5.1	5' CCA ATT CAT CCA AGC TGT CC 3'	1824 pb*
	Reverse P6	5' GGG ATT TGA ACG GTT ACA TGAG 3'	

Se Colocó 5 µL del ADNc obtenido en un eppendorf de la primera PCR con las muestras que salieron positivas al gen de la nucleocápside y adicionó 20 µL de la siguiente mistura: 6.5 µL de agua libre de nucleasas, 12.5 µL de Master mix Green (dNTP 200 µM, MgCl₂ 3,0 mM), 0.5 µL del primer Forward P5 new (20 µM) y 0.5 µL del primer Reverso P6 (20 µM).

Las temperaturas y ciclos empleadas en el termociclador fueron: para la desnaturalización 95°C por 5 minutos para luego ser aplicados 40 ciclos consistentes en 94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto y 72°C por 3 minutos,

culminado el número de ciclos ingresara a la fase de extensión a 72°C por 10 minutos.

3.3. Análisis de la información

Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron editadas utilizando los programas Chromas (<http://technelysium.com.au/wp/chromas>), Edit seq y Megalign (software DNASTar, Lassergeren v7.0) para su edición y alineamiento multiple, la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) se utilizó para confirmar la secuencia obtenida del gen H del VDC así como encontrar las secuencias de nucleótidos filogenéticamente más relacionados con nuestras secuencias disponibles en el Gen bank. El análisis filogenético de las secuencias obtenidas será realizado utilizando el programa MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (<https://www.megasoftware.net/>) el cual nos permitirá identificar los linajes de VDC de nuestras muestras en base al valor de identidad de aminoácidos al análisis filogenético. Todas las secuencias obtenidas de este estudio fueron registradas en el Genbank para su análisis, veracidad y obtención del número de acceso para poder verificar nuestros hallazgos.

El cálculo de distancia genética y construcción del árbol filogenético fue realizado utilizando el programa MEGA 7 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*).

4. RESULTADOS

De las 36 muestras de perros clínicamente diagnosticados como distemper canino; sólo 15 animales (41.7%) fueron positivos al virus de Distemper Canino (VDC) por la prueba de RT-PCR, amplificándose el fragmento de 287 pb del gen N (cuadro 5 ,6 y 7). Los productos amplificados de la RT-PCR de los perros positivos muestran un fragmento único de 287 pb confirmando el diagnóstico (figura 7).

Cuadro 5. Porcentaje de muestras que resultaron positivos al VDC por la Prueba de RT-PCR.

Resultados	N° de casos	%
Positivos	15	41.7
Negativos	21	58.3
Total	36	100

Cuadro 6. Resultado de la amplificación del gen N para el diagnóstico de distemper canino mediante el empleo de RT-PCR

Nombre	Cod. muestra	Resultado RT-PCR	Distrito/procedencia
Peluchín	D1	Positivo	Santa Anita
Chato	D2	Negativo	Ate
Saris	D3	Positivo	Lince
Arthur	D4	Positivo	Breña
Rex	D5	Negativo	La Victoria
Peque	D6	Positivo	Puente Piedra
Trixus	D7	Negativo	Ate
Simba	D8	Negativo	La Victoria
Buffi	D9	Negativo	Cercado de Lima
Chesco	D10	Negativo	San Borja

Jagger	D11	Positivo	San Martin
Zoe	D12	Positivo	Magdalena
Cusi	D13	Negativo	San Juan de M.
hanna	D14	Negativo	San Luis
Bebé	D15	Negativo	El Agustino
Samara	D16	Negativo	Lince
Doki	D17	Negativo	Jesús Maria
Alvin	D18	Positivo	Surquillo
Panda	D19	Negativo	El Rimac
Zoe	D20	Negativo	Los Olivos
Chimuelo	D21	Negativo	Magdalena
Gringo	D22	Negativo	Pueblo Libre
Kira	D23	Positivo	Ate
Negro	D24	Negativo	Cercado de Lima
Chiquita	D25	Positivo	Chaclacayo
Popotito	D26	Positivo	Magdalena
Cody	D27	Negativo	Santa Anita
Skay	D28	Positivo	San Juan de M.
Luna	D29	Positivo	El Rimac
Alba	D30	Negativo	San Juan de L.
Bruce	D31	Positivo	Villa el Salvador
Osa	D32	Positivo	Villa Maria del T.
Haru	D33	Negativo	San Borja
Chester	D34	Negativo	San Borja
Rocky	D35	Negativo	El Rimac
Bella	D36	Positivo	Surco

Cuadro 7. Resultado positivos al gen N para el diagnóstico de distemper canino mediante el empleo de RT-PCR

Nombre	Cod. muestra	Resultado RT-PCR	Distrito/procedencia
Peluchín	D1	Positivo	Santa Anita
Saris	D3	Positivo	Lince
Arthur	D4	Positivo	Breña
Peque	D6	Positivo	Puente Piedra
Jagger	D11	Positivo	San Martin
Zoe	D12	Positivo	Magdalena
Alvin	D18	Positivo	Surquillo
Kira	D23	Positivo	Ate
Chiquita	D25	Positivo	Chaclacayo
Popotito	D26	Positivo	Magdalena
Skay	D28	Positivo	San Juan de M.
Luna	D29	Positivo	El Rimac
Bruce	D31	Positivo	Villa el Salvador
Osa	D32	Positivo	Villa Maria del T.
Bella	D36	Positivo	Surco

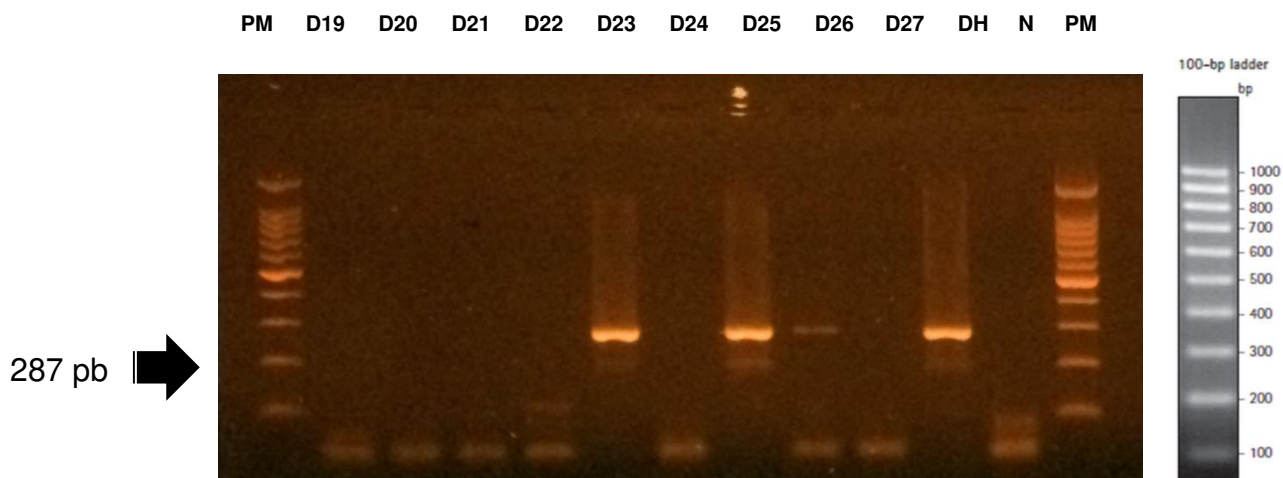


Figura 7. Resultado de la amplificación de la Nucleoproteína de 287 pb por RT-PCR de 9 de los casos con signos clínicos compatibles con DC. PM: Peso Molecular de 100pb; D19 - D27 Muestras. DH: control positivo (vacuna), N: control negativo.

Las 15 muestras positivas codificadas como D1, D3, D4, D6, D11, D12,

D18, D23, D25, D26, D28, D29, D31, D32 y D36; fueron sometidos a una nueva RT-PCR para amplificar el gen de la Hemaglutinina (H) con los cebadores presentados en el cuadro 3 y 4, para la obtención de un fragmento parcial variable del gen de 768 pb (figura 8) y el gen H completo de 1824 pb (figura 11).

Teniendo como resultado la amplificación parcial del gen H (768 pb) del 73.3% (11/15) de las muestras positivas (D6, D11, D12, D18, D23, D25, D26, D28, D29, D31 y D36), para su secuenciamiento y análisis filogenético, al analizar dichas secuencias se observaron un grupo de 8 secuencias que podrían ser parte de un nuevo linaje del virus, por tal motivo se intentó obtener el gen H completo (1824 pb) de dichas muestras, obteniendo 6 secuencias completas (D18, D23, D25, D29, D36 y D31) de dicho gen para su análisis filogenético completo.

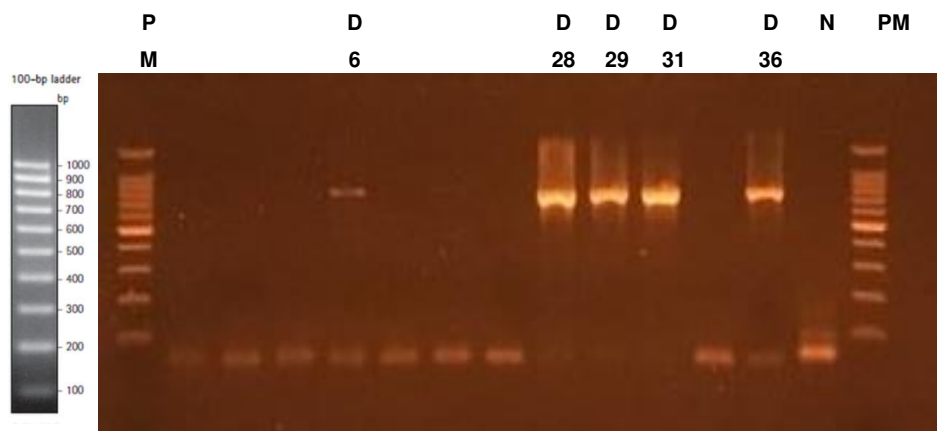


Figura 7. Resultado de la amplificación de la Hemaglutinina de 768 pb por RT-PCR de 11 de los casos positivos a distemper.

PM: Peso Molecular de 100pb; D6, D28, D29, D31, D36 Muestras. N: control negativo

Análisis de secuencias

Se obtuvo el secuenciamiento parcial del gen de la hemaglutinina de 11 muestras positivas y 2 muestras de vacunas. Ocho (8) cepas detectadas (D6, D18, D23, D25, D28, D29, D31 y D36) al ser comparadas entre ellas tienen un 100% a 99.5% de identidad de nucleótidos, lo que confirman que pertenecen a un mismo genotipo de distemper canino pero al compararlos con los 19 genotipos reportados este virus está filogenéticamente más relacionada con el genotipo America 4; aunque, claramente no pertenece a ninguno de los genotipos reportados hasta la fecha, formando un cluster diferenciado en el dendograma (figura 9 y 10). Las otras tres (3) cepas analizadas (D11, D12, y D26) tienen un 100% a 98.6% de identidad de nucleótidos con las cepas vacunales Onderstepoort y Bucharest agrupadas dentro del linaje América 1 (Figura 9 y 10).

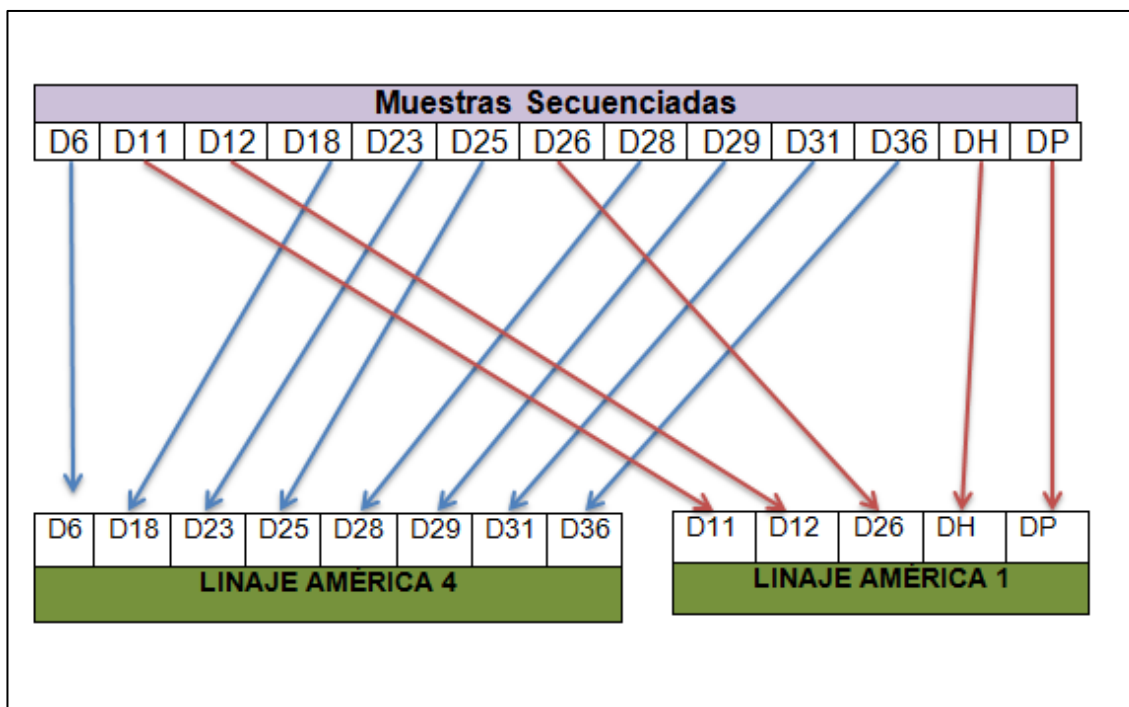


Figura 8. Se observan las 11 muestras positivas a DC que fueron secuenciadas junto a las 2 vacunas empleadas como control positivo (cepa Onderstepoort). Del secuenciamiento parcial se obtuvo como resultado dos grupos: Linaje América 1 (cepa Onderstepoort) DH, DP, D11, D12 y D26; Linaje América 4: D6, D18, D23, D25, D28, D29, D31, D36.

El análisis parcial de las 11 secuencias de 768 pb del gen H sugiere que la mayoría de las cepas identificadas pertenece a un nuevo genotipo del virus de distemper canino, por tal motivo se procedió a amplificar el gen completo de las muestras para la obtención de la secuencia completa del gen H (Figura 11) para su traslado de nucleótidos a aminoácidos de la proteína de la hemaglutinina viral, para un análisis filogenético más depurado y así determinar el genotipo circulante en el país, utilizando el criterio internacional de valor de corte (Cut-off) para la clasificación de los genotipos (linajes) de este virus que establecen el valor de corte en 96.5% de identidad de aminoácidos como mínimo para ser parte de un genotipo del VDC.

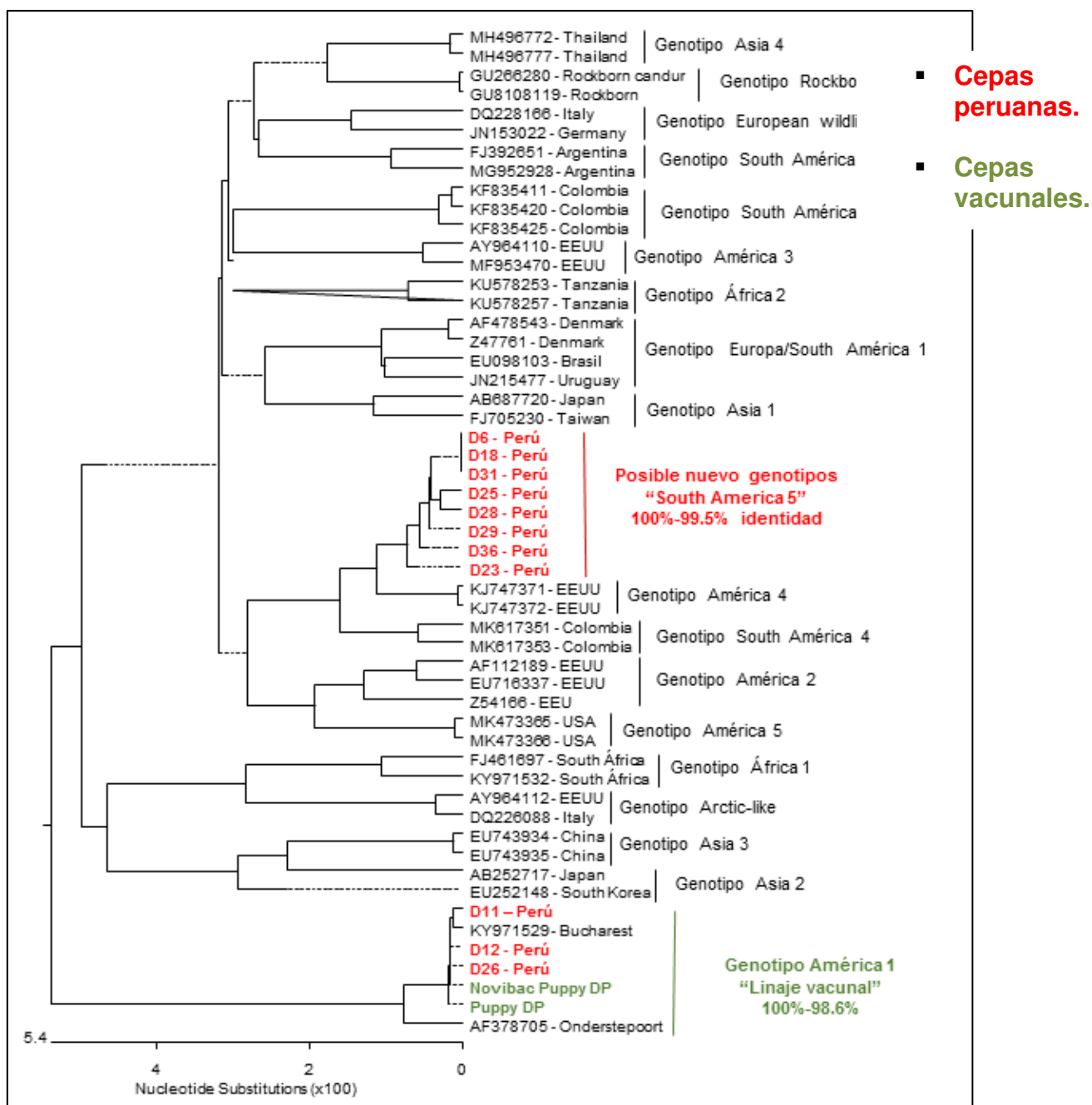


Figura 9. Dendrograma construido a partir de las secuencias parciales de la Hemaglutinina (768 pb) de los diferentes genotipos del virus de distemper canino.

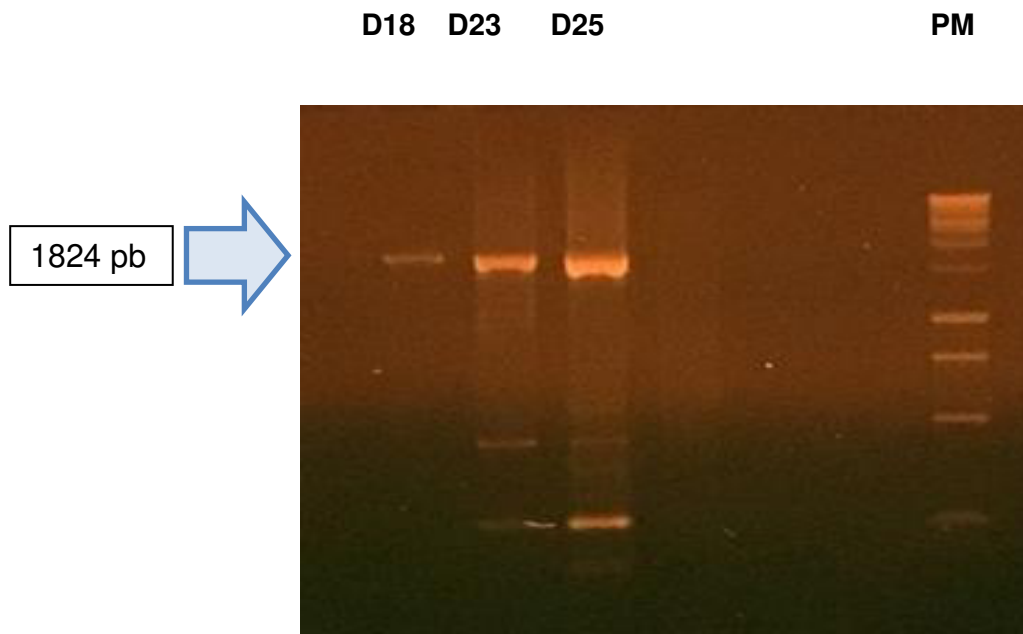


Figura 10. Resultado de la amplificación del gen completo Hemaglutinina de 1824pb por RT-PCR de 11 de los casos positivos a distemper.

PM: Peso Molecular de 500pb; D18, D23, D25; Muestras.

Se obtuvieron 6 secuencias completas del gen H (D18, D23, D25, D29, D31 y D36) las cuales se tradujeron a secuencias de aminoácidos para luego estimar a partir de la ORF completa de la proteína H (608 aa) la distancia filogenética de estas cepas con relación a los 19 genotipos reportados de VDC. El árbol filogenético fue inferido por el método de máxima verosimilitud (del inglés maximum likelihood) utilizando un bootstrap de 1000 repeticiones. La estimación de la divergencia evolutiva entre las secuencias se realizó utilizando un modelo basado en la matrix JTT. La tasa de variación de la sustitución por sitios de aminoácidos se modeló utilizando una distribución gamma ($G=0.9$). Este análisis incluyó 49 secuencias de aminoácidos, las que comprenden 6 cepas peruanas y 43 cepas aisladas de diferentes zonas geográficas del mundo representando los 19 genotipos existentes del VDC, sus secuencias fueron extraídas del Genbank mostrando el número de acceso de cada una de ellas en el árbol filogenético. Se eliminaron todas las posiciones ambiguas para cada secuencia, teniendo un total de 606 posiciones en

el conjunto de datos finales para cada una de las 49 secuencias. El análisis evolutivo se realizó utilizando el software gratuito MEGAX (Figura 12). Las secuencias de nuestro estudio fueron depositadas en el Genbank con el número de acceso provisorio: MT350712-MT350719 (Anexo 4).

Las cepas D18, D23, D25, D29, D31 y D36 al ser alineadas entre ellas muestran estar estrechamente relacionadas filogenéticamente en un rango de 100% a 97.23% de identidad aminoácidos (aa), lo indica que estas cepas pertenecen a un mismo genotipo de distemper canino. Pero a la vez se dividen en dos grupos bien definidos, en el primero agrupa las cepas D25 y D23 con un 98.83% de identidad de aa y el otro grupo de cepas (D18, D29, D31 y D36) con un 99.67% de identidad de aminoácidos, cuando comparamos las secuencias de ambos grupos la relación filogenética llegaba a 97.23% de aa, confirmando la presencia de dos subgenotipos dentro de nuestras muestras (Figura12).

El análisis filogenetico realizado para designar el genotipo correspondiente de las cepas VDC en este estudio demostró que las 6 estirpes virales no pertenecen a ningún genotipo reportado hasta la actualidad, siendo los genotipos filogenéticamente más relacionados el genotipo America 4 (95.8% - 96.87% de identidad de aa) y el genotipo South America 4 (94.29% - 95.85% de identidad). Debido a que el valor de corte (Cut-off) para ser declarado dentro de un genotipo de VDC es mayor o igual a 96.5% de identidad de aminoácidos, podemos sugerir que las cepas D18, D23, D25, D29, D31 y D36 pertenecen a un nuevo genotipo del virus de distemper canino (Figura 12).

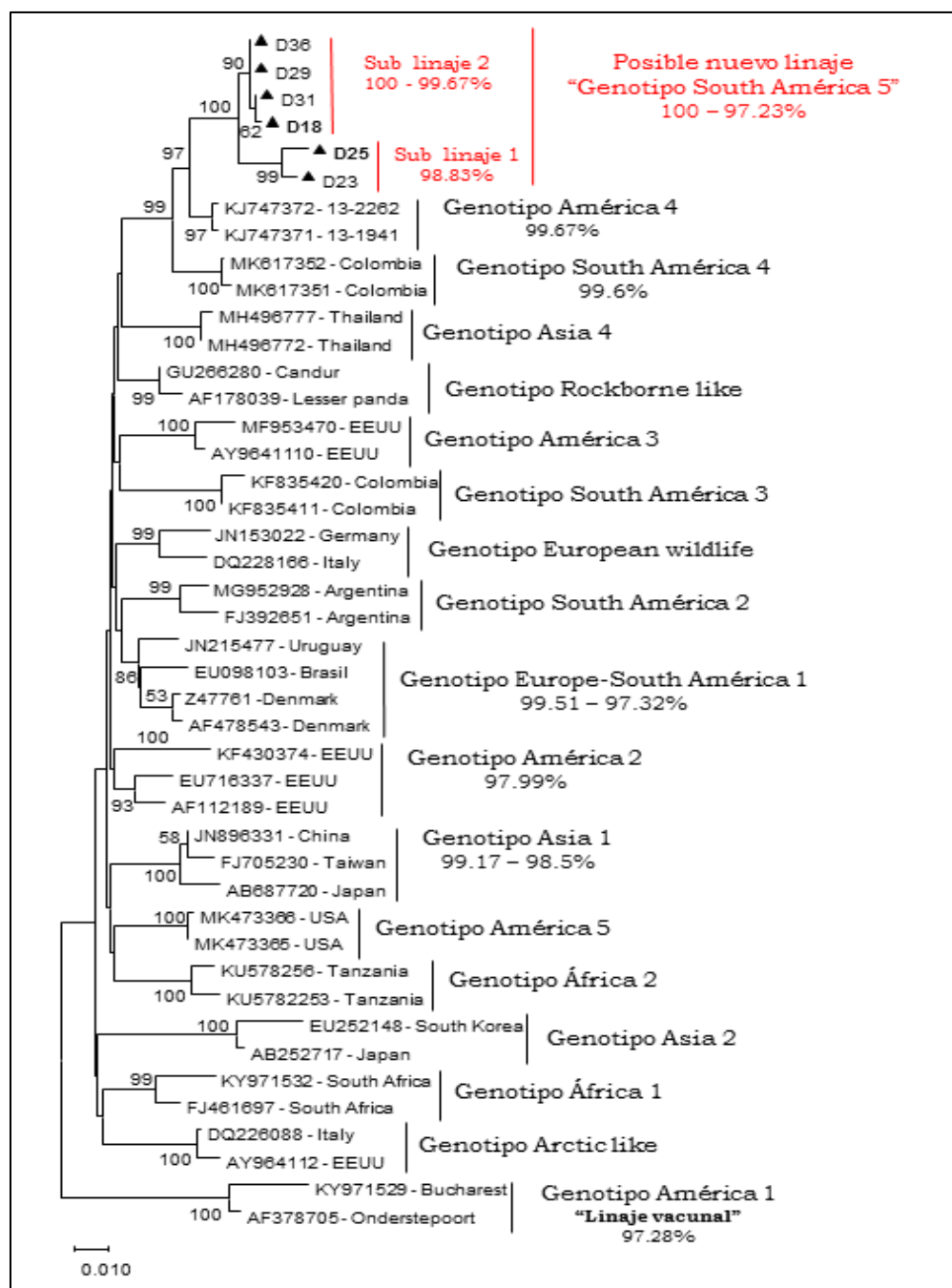


Figura 11. Dendrograma construido a partir de las secuencias completas de la Hemaglutinina de los diferentes genotipos del virus de distemper canino.

5. DISCUSIÓN

En este estudio fueron analizados 36 pacientes caninos que se presentaron a la Clínica de Animales Menores de la Facultad de Medicina Veterinaria de la universidad Nacional Mayor de San Marcos con signos clínicos compatibles de DC; se aplicó la prueba de RT-PCR puesto que el grado de sensibilidad y especificidad es muy alta (Saito, 2006). Al análisis de las 36 muestras 15 animales (41.7%) fueron positivos a la enfermedad de Distemper Canino por la prueba de RT-PCR, amplificándose el fragmento de 287 pb del gen N; por lo tanto, se comprende que el 58.3% de casos pese a poseer sintomatología compatible con DC; fueron negativos, valor muy próximo (40.2% de casos positivos) a la investigación realizada en Brasil entre los años 2008 – 2012 (Da Fontaura *et al.*; 2014). La causas de este alto número de mal diagnóstico clínico se debe a que la sintomatología presente en perros es muy variada y vista en distintas enfermedades virales y bacterianas que afectan a los perros de Lima (Soto, 2017) y también a la presunción que el distemper es la enfermedad más frecuente que afecta a los perros de Lima metropolitana por la poca cobertura de vacunación en la población canina de Lima.

El uso de la orina como la muestra a ser utilizada en este estudio es debido a que la orina fue descrita como la muestra idónea para determinar la presencia viral en las distintas etapas de la enfermedad (viremia, distribución a tejido epitelial o infección del tejido nervioso) (Saito *et al.*, 2006; Kim *et al.*,2006) lo cual disminuye un falso negativo, sobretodo en perros con signos nerviosos ya que tenemos 19 perros con signos nerviosos y de los cuales 9 de ellos (47.4%) salieron positivos al virus de distemper canino.

Para el diagnóstico del VDC mediante el uso del RT-PCR se recomienda las muestras de sangre completa, hisopado conjuntival y la orina (Saito *et al.*, 2006 , Kim *et al.*, 2006); pero, es muy importante tomar en cuenta la etapa de la infección y la presentación clínica de la enfermedad. Un estudio realizado en Bari

(Italia), comprobó que la sangre y la orina son las muestras más adecuadas para el diagnóstico del VDC, dicho estudio se realizó con dos perros con sintomatología de DC, en uno de los canes se logró detectar la enfermedad empleando la PCR en tiempo real con muestras de sangre y orina (Fischer *et al.*, 2013, Elia *et al.*, 2015). Se pudo concluir en dicho estudio también que la etapa clínica y la forma de la enfermedad, son data importante para el diagnóstico y que la orina parece ser la muestra más adecuada para el diagnóstico (Elia *et al.*, 2015).

Se pudo comprobar en un estudio realizado en el 2006, que el empleo del RT-PCR para el diagnóstico tiene una alta sensibilidad sin embargo esta sensibilidad varía por el tipo de muestra (suero, sangre, líquido cefalorraquídeo u orina), la forma de extracción de ARN viral y la elección de cebadores (Saito, 2006). Se detectó el virus de la vacuna en la orina como máximo al segundo día post vacunación, pero un periodo más prolongado y con mayor frecuencia en las heces, saliva, lágrimas y secreciones nasales. Por lo tanto la vacunación no complicaría el diagnostico mediante la detección del virus en la orina. (Saito, 2006).

En nuestro estudio el diagnóstico molecular se realizó utilizando al gen N como blanco, esto debido a tener más copias por virión dentro del genoma del virus y a la vez es altamente conservado y permite determinar la presencia de los diversos genotipos de VDC (Soto, 2017). En nuestro estudio se determinó que 15 perros eran infectados con el VCD y que fue más sensible que el del gen H que permitió detectar a 11 perros debido a que este gen tiene menos copias por virión y además es genéticamente más variable, en este estudio concluimos que fueron 15 los perros infectados y que solo se trabajaron 11 cepas de campo para el estudio del gen H por la capacidad de detección de los cebadores utilizados.

De las seis proteínas estructurales que presenta el VDC, el gen H es el que presenta mayor variabilidad genética por lo tanto es adecuado para estudiar polimorfismo y también se debe recordar que el tropismo viral es determinado por este mismo gen; la infección se inicia por la unión a su receptor de la molécula de activación linfática SLAM y Nectin-4 del tejido epitelial; es decir, el desarrollo de la

enfermedad del DC debe pasar por dos fases; infección aguda al sistema linfático seguida de la infección de células epiteliales las cuales facilitan la eliminación viral (Da Fontaura *et al.*, 2014; Duque *et al.*, 2019); la variación genética y antigénica del gen H afecta los sitios relacionados con la neutralización e interrupción de epítomos importantes (Martella *et al.*, 2006).

Basado en análisis filogenético de las secuencias del gen de la Hemaglutinina y su variabilidad, el VDC se pudo clasificar en linajes genéticos distribuidos alrededor del todo el mundo de acuerdo a un patrón geográfico (Anis *et al.*, 2018). La condición para la asignación de linaje establece que dos cepas que pertenecen al mismo linaje si se agrupan en el árbol filogenético y muestran una divergencia de aminoácidos $H < 3.5\%$ o en otras palabras con un valor de corte (Cut-off) de 96.5% o menos de identidad de aminoácidos (Martella *et al.*, 2006, Duque *et al.*, 2019). La generación de linajes de VDC parece ser parte del proceso evolutivo del virus con su relación al hospedero.

El análisis del gen H del VDC reveló que existen al menos tres linajes principales que circulan en Estados Unidos, ninguno de estos linajes muestra estrecha relación genética con la Cepa de la vacuna Onderstepoort utilizada comúnmente (Martella *et al.* 2006) esto indicaría que la aparición de un nuevo linaje en Lima es posible y se debe hacer más estudios si este nuevo linaje escapa del sistema inmune estimulado por las vacunas con cepas del linaje America 1 clásica que se utilizan en Lima. Por el análisis de las secuencias de las cepas obtenidas en este trabajo podemos confirmar la circulación de 2 genotipos diferentes en nuestras muestras. 3 cepas pertenecientes al genotipo América 1 teniendo una identidad de aminoácidos entre 100% a 98.6% con una cepa vacunal Onderstepoort y 8 cepas que pertenecen aparentemente a un nuevo del VDC al tener un valor de identidad de aminoácidos menor del 96.5% al ser comparados con las cepas padrones de los 19 genotipos existentes. Estas 8 cepas están filogenéticamente más relacionados con el genotipo América 4 con un rango de 95.8 a 96.7% de identidad de aa. Cabe resaltar que este genotipo solo tiene 2 cepas secuenciadas y reportadas en un perro

y un zorro de EEUU; aparentemente, este genotipo apareció en el año 2011 y se diseminó en los perros de las regiones del Norte de los EEUU (Riley y Wilkes. 2015)

El uso de las vacunas vivas atenuadas se han empleado desde 1950 para poder controlar la enfermedad del DC, Sin embargo, se siguen reportando brotes en canes domésticos y salvajes en diferentes áreas geográficas; en 1980 se registraron brotes de DC en perros inmunizados y no inmunizados los cuales fueron consecuencia de infecciones naturales con cepas de campo no relacionadas con las cepas vacunales (Panzera et al.; 2015, Riley y Wilkes. 2015; Forero, 2016); cabe recalcar que cepas del VDC de la vacuna clásica derivan del genotipo América I; excepto, la cepa de vacuna Rockborn que fue retirada en varios mercados en 1990 por informes donde se le atribuye la presentación de encefalitis post vacunal (Da Fontaura *et al.*; 2014).

En la actualidad pese que se cuente con vacunas y programas de vacunación contra el DC, en el mundo y en el Perú es un número considerable de casos clínicos en pacientes inmunizados; entonces esto nos lleva interpretar que existen factores que pueden llevar al fracaso de la vacunación, entre ellos la ruptura de la cadena de frío desde su transporte al almacenamiento (afecta la conservación del inmunógeno), el empleo de inadecuados protocolos de vacunación, inmunidad pasiva de origen materno, estado fisiológico del paciente o la desconocida diversidad genotípica del virus en nuestro país que no sería cubierta por las cepas vacunales disponibles (Forero, 2016).

La falta de conocimiento local y regional de los genotipos virales circulantes del distemper canino en campo y comparación con los genotipos vacunales, abre una brecha de incertidumbre que le quita certeza al rango de protección del los inmunógenos utilizados en la actualidad (Espinal *et al.*, 2014)

6. CONCLUSIONES.

1. El virus del distemper canino está presente en Lima metropolitana, existiendo al menos dos linajes distintos de los genotipos (linajes) América 1 causando distemper clínico con la diversidad de sintomatología.
2. Se propone un nuevo genotipo o linaje de VDC presente en Lima Metropolitana.

7. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

1. **Anderson D, Messling V. 2008.** Region between the Canine Distemper Virus M and F Genes Modulates Virulence by Controlling Fusion Protein Expression. *Journal of Virology* 82 (21): 10510 – 10518. Doi: 10.1128/JVI.01419-08
2. **Anis E, Holford A, Galyon G, Wilkes R. 2018.** Antigenic analysis of genetic variants of canine distemper virus. *Veterinary Microbiology* 219. 341-349. Doi: 10.1016/j.vetmic.2018.03.014
3. **Appel M, Shek W, Shesberadaran H, Norrby E. 1984.** Measles virus and inactivated canine distemper virus induce incomplete immunity to canine distemper. *Arch of Virol.* 82, 73-82.
4. **Appel M, Reggiardo C, Summers B, Pearce-Kelling S, Maré C, Noon T, Reed R, Shively J, Örvell C. 1991.** Canine distemper virus infection and encephalitis in javelinas (collared peccaries). *Arch. Virol* 119: 147-152.
5. **Appel M, Summers J. 1999.** Distemper canino: estado actual. Institute for Animal Health, College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, New York, USA. 5p.
6. **Barengo F, Perez R, Nieto M. 2018.** Detección de antígeno del virus del Moquillo canino en fase aguda. Tesis de medicina veterinaria. Buenos Aires. Universidad nacional del centro de la provincia de buenos aires. 30p
7. **Bhatt M, Rajak K, Chakravarti S, Yadav A, Kumar A, Gupta V, Chander V, Mathesh K, Chandramohan S, Sharma A, Mahendran K, Sankar M, Muthuchelvan D, Gandham R, Baig M, Singh R, Singh R. 2019.** Phylogenetic analysis of haemagglutinin gene deciphering a new genetically distinct lineage of canine distemper virus circulating among domestic dogs in India. *Transboundary and Emerging Diseases* 66 (3). Doi;10.1111/tbed.13142
8. **Birchard S, Sherding R. 2006.** Saunders Manual of small animal practice. ScienceDirect. Third edition. 154 -157p. Doi.org/10.1016/B0-72-160422-6/50015-2

9. **Blancou J. 2004.** Dog distemper: imported into Europe from South America. *Historia Medicina Veterinaria*. 29: 35-41.
10. **Buñá T. 2019.** Diagnóstico Comparativo de Moquillo Canino (*Canis lupus familiaris*) Machos y Hembras Mediante la técnica de Elisa Cuantitativa y Elisa Cualitativa. Tesis medicina veterinaria y zootecnia. Cuenca. Universidad Politécnica Salesiana. 118p
11. **Calderón M, Remorini P, Periolo O, Iglesias M, Mattion N, La Torre J. 2007.** Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *Veterinary Microbiology* 125(3-4): 341-349. Doi:10.1016/j.vetmic.2007.05.020
12. **Céspedes P, Cruz P, Navarro C. 2010.** Modulación de la respuesta
13. inmune durante la infección por virus de distemper canino: implicancias terapéuticas y en el desarrollo de vacunas. *Archivos de Medicina Veterinaria* 42(2): 15-28.
14. **Chen M, Xin T, Hou S, Lin W, Song W, Zhu H, Huang K, Jia H. 2018.** Genotyping and pathogenic characterization of canine distemper virus based on mutations in the hemagglutinin gene in Chinese domestic dogs. *Polish Journal of Veterinary Science* 21 (3): 623-629. Doi:10.24425/124301
15. **Craig E, Sykes J. 2000.** Enfermedades infecciosas en perros y gatos. 2da edición. Mexico DF. McGraw-Hill. Interamericana Editores, S.A. 1014p
16. **Da Fontaura R, Dubina L, Nunes M, Teles E, Beduschi C, Martella V, Ikuta N, Lunge V, Wageck C. 2014.** Genotyping of canine distemper virus strains circulating in Brazil from 2008 to 2012. *Virus Research* 180: 76-83p. Doi: 10.1016/j.virusres.2013.12.024
17. **Del Puerto H, Vasconcelos A, Moro L, Alves F, Braz G, Martins A. 2010.** Canine distemper virus detection in asymptomatic and non vaccinated dogs. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 30(2). Doi: 10.1590/s0100-736x2010000200007
18. **Duque J, Sarute N, Olarte X, Ruiz J. 2019.** Evolution and Interspecies Transmission of Canine Distemper Virus- An Outlook of the Diverse

Evolutionary Landscapes of a Multi-Host Virus. MDPI .doi: 10.3390 / v11070582

- 19. Elia G, Decaro N, Martella V, Cirone F, Lucente MS, Lorusso E, Di trani L, Bounavoglia. 2006.** Detection of canine distemper virus in dogs by real – time RT-PCR. J Virol Methods 136 (1-2): 171-176. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.05.004
- 20. Elia G, Camero M, Losurdo M, Lucente M, Larocca V, Martella V, Decaro N, Buonavoglia C. 2015.** Virological and serological findings in dogs with naturally occurring distemper. Veterinary Microbiology 213 (1): 127-130. Doi: 10.1016/j.jviromet.2014.12.004
- 21. Espinal M, Diaz F, Ruiz J. 2014.** Phylogenetic evidence of a new canine distemper virus lineage among domestic dogs in Colombia, South America. Veterinary Microbiology 172 (1-2) 168-176. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.05.019
- 22. Ettinger S, Feldman E. 2010.** Textbook of Veterinary Internal Medicine Expert Consult. 7th edition. 2208 p
- 23. Ferreira. V, de Camargo C, Rodríguez C. 2016.** Canine distemper virus detection by different methods of One-Step RT-qPCR. Ciencia Rural 46(9). doi: 10.1590/0103-8478cr20150932.
- 24. Fischer CD, Ikuta N, Canal CW, Makiejczuk A, Allgayer Mda C, Cardoso CH, Lehmann FK, et al. 2013.** Detection and differentiation of field and vaccine strains of canine distemper virus using reverse transcription followed by nested real time PCR (RT-nqPCR) and RFLP analysis. J Virol Methods 194(1-2): 39-45. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.08.002. 2013.
- 25. Forero N. 2016.** Caracterización molecular de genotipos vacunales y de campo del virus del distemper canino en Bogotá D.C. – Colombia. Bogotá: Universidad de La Salle. 40p
- 26. Frisk A, König M, Moritz A, Baumgärtner W. 1999.** Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using

serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. J Clin Microbiol. 37(11):3634-43.

27. **Fuques E. 2017.** Análisis filodinámico del Virus Distemper Canino. Tesis grado Licenciatura en Bioquímica. Montevideo. Universidad de la República de Uruguay. 62p
28. **Gallo M, Remorini P, Periolo O, Iglesias M, Matión N, La Torre J. 2007.** Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non – vaccinated dogs in Argentina. Veterinary Microbiology, 125 (3-4): 341-349. doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.05.020
29. **Gebara CMS, Wosiacki S, Negrão F, De Oliveira D, Beloni S, Alfieri A. 2004.** Detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina por RT-PCR em urina de cães com sinais clínicos de cinomose. Arq. Bras.Med. Vet Zootec. 56: 480-487. Doi: 10.1590/S0102-09352004000400009
30. **Greene C, Appel M. 1998.** Canine distemper. In: Greene, C.E. (Ed.). Infectious Diseases of the Dog and Cat. WB Saunders Company. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo. Pp. 9-22.
31. **Greene C, Appel M. 2006.** Canine distemper. In: Greene, C.E. (Ed.). Infectious Diseases of the Dog and Cat. Saunders Elsevier, St Louis 25-41p
32. **Hurtado J. 2017.** Prevalencia de distemper canino (*Canis lupus familiaris*) en la ciudad de Abancay, 2017. Tesis medicina veterinaria y zootecnia. Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac. 87p
33. **ICTV. 2019.** Taxonomy history: canine distemper virus. EC 51. Germany
34. **Józwik A, Frymus T. 2005.** Comparison of the Immunofluorescence Assay with RT-PCR and Nested PCR in the Diagnosis of Canine Distemper. Vet Res Commun 29: 347-359. Doi.10.1023/b:verc.0000048528.76429.8b
35. **Karlin D, Longhi S, Receveur V, Canard B. 2002.** The N-terminal domain of the phosphoprotein of morbillivirus belong to the natively unfolded class of proteins. Virology 296: 251-262.
36. **Kim D, Jeoung S, Ahn S, Lee J, Pak S, Kwon H. 2006.** Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in

- experimentally infected dogs. *Journal of Veterinary Medical Science* 68 (8): 877-879. Doi: 10.1292/jvms.68.877
37. **Lamb R, Parks G. 2007.** Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication. *Fields virology*. 5th ed. 1449 – 1496
 38. **Lamb R, Parks G. 2013.** Paramyxoviridae: The viruses and Their Replication. *Fields virology*. 6th ed. 957 – 995
 39. **Lauring AS, Andino R, 2010.** Quasispecies theory and the behavior of RNA viruses. *PLoS Pathog*. 6 (7). Doi: 10.1371 / journal.ppat.1001005
 40. **Linares V. 2010.** Diagnóstico de Moquillo Canino con la prueba Dot-ELISA. Departamento de Salud Animal. Tesis. Universidad de Caldas, Manizales, Colombia. 78p
 41. **Li Shuang, Yi L, Cao Z, Cheng Y, Tong M, Wang J, Lin P, Cheng S. 2018.** Identification of linear B – cell epitopes on the phosphoprotein of canine distemper virus using four monoclonal antibodies. *Virus Research* 257: 52 – 56.
 42. **Lunardi M, Molinari G, Mendes A, Arlington S, Sonne L, Ito K, Marques F, Fernandes A, Alcindo A. 2018.** Canine distemper virus active infection in order Pilosa, family Myrmecophagidae, species *Tamandua tetradactyla*. *Veterinary Microbiology* 220: 7-11. doi: 10.1016 / j.vetmic.2018.04.030.
 43. **Martella V, Cirone F, Elia G, Larusso E, Decaro N, Campolo M, Desario C, Lutence M, Bellacicco A, Blixenkrone-Moller M, Carmichael L, Buonavoglia C. 2006.** Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Veterinary Microbiology* 116 (4): 301-309. Doi: 10.1016/j.vetmic.2006.04.019.
 44. **Martella V, Elia G, Buonavoglia C. 2008.** Canine Distemper Virus. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 34(4): 787-797 doi.org/10.1016/j.cvsm.2008.02.007

- 45. Martella V, Gamiz C, Ulloa R, Fajardo R, Quijano H, Martinez S. 2011.** Identification of a new genotype of canine distemper virus circulating in America. *Vet Res Commun* 35: 381-390. doi 10.1007/s11259-011-9486-6
- 46. Martinez M, Ruiz J. 2016.** Diversity of susceptible host in canine distemper virus infection: A systematic review and data synthesis. *BMC Veterinary Research* 12:78. Doi: 10.1186/s12917-016-0702-z
- 47. Messling V, Zimmer G, Herrler G, Haas L, Cattaneo R. 2001.** The Hemagglutinin of Canine Distemper Virus Determines Tropism and Cytopathogenicity. *Journal of virology* 75(14): 6418-6427. Doi: 10.1128/JVI.75.14.6418-6427.2001
- 48. Messling V, Springfield C, Cattaneo R. 2003.** A ferret model of canine distemper virus virulence and immunosuppression. *Journal of Virology* 77(23): 12579-12591. Doi: 10.1128/jvi.77.23.12579-12591.2003
- 49. Messling V, Milosevic D, Cattaneo R. 2004.** Tropism illuminated: Lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Doi: 10.1073/pnas.0403597101
- 50. Messling V, Oezguen N, Zheng Q, Vongpunswad S, Braun W, Cattaneo R. 2005.** . Nearby clusters of hemagglutinin residues sustain SLAM-dependent canine distemper virus entry in peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Virology* 79 (9): 5857-5862. Doi: 10.1128/JVI.79.9.5857-5862.2005
- 51. McCarthy A, Shaw M, Goodman J. 2007.** Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. *The Royal Society* 274 (1629): 3165-3174 Doi:10.1098/rspb.2007.0884
- 52. Muñoz C. 2013.** Diagnóstico Molecular del Virus Distemper canino Mediante la Reacción en cadena de la polimerasa asociada a la transcripción inversa del gen de la proteína de la nucleocapside viral. Tesis medicina veterinaria. Perú: Universidad de Chile. 32p

53. **Murphy F, Gibbs E, Horizinek M, Studdert M. 1999.** Paramyxoviridae. Veterinary Virology. Editon 3. Academia Press. New York. USA. 411-428p
54. **Nelson R, Couto C. 2010.** Medicina interna en pequeños animales. 4ta edición. España: ELsevier. 1504p.
55. **Panzerá Y, Sarute N, Iraola G, Hernández M, Pérez R. 2015.** Molecular phylogeography of canine distemper virus: geographic origin and global spreading. Molecular Phylogenetics and evolution 92: 147–154. Doi: 10.1016/j.ympev.2015.06.015
56. **Paz V. 2013.** Análisis filogenético del Gen de la Hemaglutinina del virus de distemper canino en perros infectados naturalmente en Chile. Tesis Medicina Veterinaria. Chile. Universidad de Chile. 27p
57. **Pedrosa A. 1999.** Reacción en Cadena de la polimerasa. Archivo Médico de Camagüey. Vol 3 (2).
58. **Pinotti A. 2011.** Distemper canino: evaluación de dos alternativas terapéuticas y caracterización de aspectos clínico-epidemiológicos en la ciudad de Santa Fe, durante los años 1998 - 2009. Tesis de magister medicina veterinaria. Santa Fe: Universidad Nacional del Litoral. 114p.
59. **Pinotti M, Gollan A, Passeggi C, Formentini E. 2012.** Aspectos clínicos y epidemiológicos del Distemper canino. Estudio de casos diagnosticados en la ciudad de Santa Fe, entre los años 1998 y 2009. REV FAVE-Ciencias Veterinarias 11 (1/2) 83-84. doi.org/10.14409/favecv.v11i1/2.4565
60. **Pinotti M, Gollan A, Passeggi C, Blainq L, Reutemann S, Picco E, Formentini E. 2014.** Distemper canino: evaluación de dos alternativas terapéuticas. FAVE sección Ciencias Veterinarias 12 (1/2) 87-98. doi.org/10.14409/favecv.v12i1/2.4548
61. **Rendón S, da Fontoura R, Canal C, Ruiz J. 2019.** Tropism and molecular pathogenesis of canine distemper virus. Virology Journal 16(30). doi.org/10.1186/s12985-019-1136-6

- 62. Riley M, Wilkes R. 2015.** Sequencing of emerging canine distemper virus strain reveals new distinct genetic lineage in the United States associated with disease in wildlife and domestic canine populations. *Virology Journal* 12: 219. Doi: 10.1186/s12985-015-0445-7
- 63. Rima B, Balkema-Buschmann A, Dundon W, Duprex P, Easton A, Fouchier R, Kurath G, Lamb R, Lee B, Rota P, Wang L. 2019.** Perfil de taxonomía de virus: ICTV: *Paramyxoviridae*. *Journal of General Virology* 100: 1593 – 1594
- 64. Ríos M, Rocío F. 2015.** Detección molecular del gen de la fosfoproteína del virus distemper canino en muestras de sangre de perros. Chile: Universidad de Chile. 30pp
- 65. Roman M. 2014.** Moquillo canino. Tesis. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro “Unidad Laguna”. Mexico. 28pp
- 66. Rudd P, Cattaneo R, von Messling V. 2006.** Canine Distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. *J Virol.* 80: 9361- 9370.
- 67. Saito T, Alfieri A, Wosiacki S, Negrão F, Morais H. 2006.** Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase – polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. *Research in Veterinary Science* 80 (1): 116-119. Doi: 10.1016/j.rvsc.2005.03.002
- 68. Salas V. 2013.** Análisis filogenético del gen de la hemaglutinina del virus distemper canino en perros infectados naturalmente en Chile. Memoria de Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad Medicina Veterinaria. 23 p.
- 69. Sarute N. 2013.** Análisis de la dinámica poblacional del virus distemper canino mediante secuenciación masiva. Tesis de Doctorado. PEDECIBA. Uruguay. 141p

70. **Sarute N, Gallo M, Pérez R, La Torre J, Hernadez M, Francia L, Panzera Y. 2013.** The fusion protein signal-peptide-coding region of canine distemper virus: a useful tool for phylogenetic reconstruction and lineage identification. Plos One. 8(5): 1-6. Doi: 10.1371/journal.pone.0063595
71. **Si W, Zhou S, Wang Z, Shang J. 2010.** A multiplex reverse transcription-nested polymerase chain reaction for detection and differentiation of wild-type and vaccine strains of canine distemper. J virol 7: 86. doi.org/10.1186/1743-422X-7-86
72. **Soto R. 2017.** Detección molecular del virus del distemper canino en casos clínicos de caninos domésticos no vacunados y determinación de factores de riesgo. Tesis de medicina veterinaria. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 71p
73. **Sugai A, Kooriyama T, Sato H, Yoneda M, Ka Ch. 2009.** Epitope mapping of canine distemper virus phosphoprotein by monoclonal antibodies. Microbiol. Immunol. 53: 667 -674.
74. **Tizzano M. 2013.** Análisis de las propiedades inmunogénicas de las glicoproteínas de envoltura del virus de Distemper Canino expresadas en Pichia Pastoris. Tesis doctorado en Ciencias Veterinarias. Buenos Aires. Universidad Nacional de La Plata. 100p
75. **Vagnozzi A, Carrillo C. 2006.** Análisis comparativo del Gen P de Rinderpest virus (RPV). InVet. 8(1): 67 -91.
76. **Varner JG. 1983.** Dogs of the Conquest. University of Oklahoma. 238 p
77. **Wakasa C, Iwatsuki K, Ohashi K, Nakamura K, Kay Ch. 2000.** Sequence analysis of the genes encoding the phosphoprotein of recent isolates of canine distemper virus in Japan. J. Vet.Med. Sci.62 (1): 97 – 101.
78. **Warner T, Mazar S, Keren-Kornblatt E. 2006.** Evaluation of a dot Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Evaluation of the immune status to Canine Parvovirus and Distemper Virus in Adult dogs before Revaccination. Journal

Vet Diagn Invest. 18(3): 267-270. Doi: 10.1177/104063870601800306.
PMID: 16789715.

8. ANEXOS

Anexo 1.

Los perros importados del Viejo Mundo como las razas galgo y mastín, que fueron muy apreciados y utilizados ampliamente en la caza y la guerra, son comunes en los documentos históricos. Los perros de guerra llevaban armadura y eran especialmente efectivos para detectar emboscadas, una táctica de batalla comúnmente utilizada por los nativos Americanos (Varner, 1983).



Los perros estaban expuestos regularmente a la carne humana plagada de sarampión en el Nuevo Mundo. Esta imagen fue extraída, de un relato de 1598 de Bartolomé de Las Casas (Narración de Las Casas), muestra a una madre nativa americana enferma que se ahorcó para escapar de los soldados europeos que atacaban su aldea (Varner, 1983). Un conquistador español está alimentando a los perros con niños nativos después de que un sacerdote los haya bautizado. En América Central y del Sur, incluso durante la época de las mayores pandemias de sarampión , los perros de guerra se utilizaron ampliamente para someter la resistencia aborigen hasta que prevaleció el clamor contra la crueldad (Varner, 1983). El contacto con tejido infectado con HNV también ocurrió con gran frecuencia

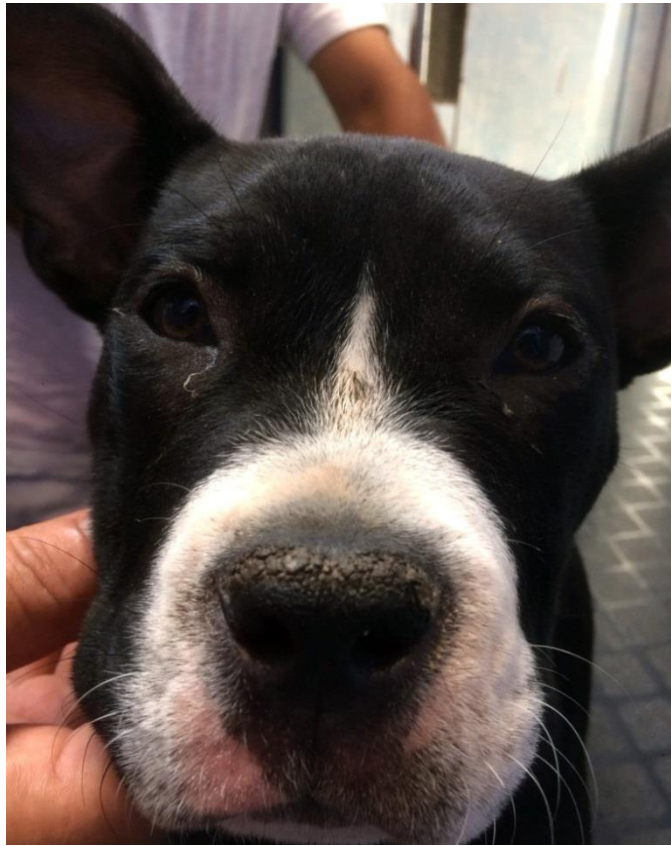
cuando los perros autóctonos escarbaron la carne de la miríada de cadáveres que se acumularon durante las devastadoras epidemias de sarampión.



Anexo 2. Signos clínicos



Hipoplasia del esmalte



Hiperqueratosis Nasal.

Anexo 3. Diagnostico



Prueba rápida para diagnóstico de distemper canino.

Anexo 4.

8 Secuencias del gen H completo depositados en el Genbank con números de acceso provisionales MT350712-MT350719:

LOCUS Seq1 1824 bp mRNA linear VRL 16-APR-2020
DEFINITION Canine morbillivirus strain strain CDV18 isolate canine distemper virus.
ACCESSION: Seq1
VERSION
KEYWORDS.
SOURCE Canine morbillivirus
ORGANISM Canine morbillivirus
Viruses; Riboviria; Negarnaviricota; Haploviricotina;
Monjiviricetes; Mononegavirales; Paramyxoviridae;
Orthoparamyxovirinae; Morbillivirus.
REFERENCE 1 (bases 1 to 1824)
AUTHORS Gutierrez,C., Oviedo,N., Manchego,A. and Rojas,M.
TITLE Genotyping of canine distemper virus lineages present in domestic dogs (Canis lupus familiaris) from metropolitan Lima, Peru
JOURNAL unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1824)
AUTHORS Gutierrez,C., Oviedo,N., Manchego,A. and Rojas,M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (16-APR-2020) Inmunologia y virologia veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Avenida circunvalacion cdra 28, San Borja, Lima, Lima 51, Peru
COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:mrojasmontes@gmail.com

Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:8

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1824
 /organism="Canine morbillivirus"
 /mol_type="mRNA"
 /strain="strain CDV18"
 /isolate="canine distemper virus"
 /isolation_source="urine"
 /host="Canis lupus familiaris"
 /db_xref="taxon:11232"
 /country="Peru"
 /collection_date="10-Nov-2018"

gene <1..>1824
 /gene="H"

mRNA <1..>1824
 /gene="H"
 /product="Hemagglutinin"

CDS <1..1824
 /gene="H"
 /note="possible new genotype of canine distemper virus"
 /codon_start=1
 /product="Hemagglutinin"
 /product="H"
 /translation="MLSYRDKVGAFYKDNARANSSKLSLVTEEQGGRRPPYLLFVLLI

LLVGIMALLAITGVRFHQVSTSNTEFSRLLKEDMEKSEAVHHQVIDVLTPLFKIIGDE

IGLRLPQKLNEIKQFILQKTNFFNP NREFDFRDLHWCINPPSKIKVNFTNYCDTIGIR
 KSIASAANPVLLSALSGGRGDIFPPYRCNGATISVGKIFPLSVLSMSLISRTSEIIN
 MLTAISGGVYGKTYLLMPDYTEGEFDTQKIRVFEIGFIKRWLN NMPLLQTTNYMVLPA
 NYKAKVCTIAVGELALASLCVDESTVSLYHDSNGSQDGVLVVTMGIFGATSMDQVEEV
 IPVAHPLVEKIHITNHRGIIKDSIVTWMVPALVSEKQEEQKNCLESACQRKSYPMCNO
 TSWEPFGGGQLPSYGRLTLPLDPSIDLQLNISFTYGPIILNGDGMDYYESPLLD SGWL
 TIPPKNGTVLGLINKASRGDQFTVIPHVLT FAPRESSRNCYLP IQTSQIMDKDVLTES
 NLVVLPTQNF RYVVATYDISRDDHAIVYYVYDPIRTISYTYPFRLTTKGRPDFLRIEC
 FVWDDDLWCHQFYRFEADITNSTTSVENLVRMSFSCNRSKP"

BASE COUNT 545 a 382 c 392 g 505 t

ORIGIN

1 atgctctcct accgagacaa ggtgggtgcc ttctataagg acaatgctag agctaattca
 61 tccaagctgt ccctagtgac agaagagcaa gggggcagga gaccacccta ttgctgttt
 121 gtccttctca tcctactggt tgggatcatg gccttgcttg ctatcactgg agttcgattt
 181 caccaagtat caactagcaa tacggaattt agcagattgc tgaaagagga tatggagaaa
 241 tcagaggccg tacatcacca agtcatagat gtcttgacac cgctcttcaa aattattgga
 301 gatgagattg gattacggtt gccacaaaaa ctaaacgaga tcaaacaatt tacccttcaa
 361 aagacaaact tcttcaatcc gaacagggaa ttcgacttcc gcgatctcca ctgggtgcatt
 421 aaccaccta gtaagatcaa ggtgaatttc actaattact gcgatactat tgggatcaga
 481 aaatctattg catcggcagc aaatcccgtc cttttatcag cactctccgg aggcagaggt
 541 gacatattcc caccatacag atgcaatggg gctactattt cagtaggcaa gattttccct
 601 ctatcagtat cattatctat gtctttgatc tcaagaacat cagagataat caatatgcta
 661 actgctatct caggcggagt gtatggtaaa acttatttac taatgcctga ttatactgaa

721 ggggagttcg acacgcaaaa gattcgtgtc ttgagatag ggttcatcaa gcggtggctg
 781 aataacatgc cattactcca gacaaccaac tatatgggcc tcccggcgaa ttacaaagct
 841 aaagtatgca ctatagcagt gggcgagttg gcactggctt ctttgtgtgt agatgagagc
 901 accgtatcgt tatatcatga cagcaatggg tcacaagatg gtgttttagt agtgacgatg
 961 ggaatattcg gggcaacatc tatggatcaa gttgaagagg tgatacctgt cgctcaccca
 1021 ttagtagaaa aaatacatat aacaaatcac cgtgggatca taaaagattc aatagtaacc
 1081 tggatggtgc ctgcattagt ttctgagaaa caagaggaac aaaaaaattg tctagagtca
 1141 gcttgtcaaa gaaaatccta ccctatgtgc aatcaaacgt catgggaacc ctttggagga
 1201 ggacagttgc catcttatgg gcgattgaca ttaccttag atccgagcat tgacctcaa
 1261 cttaacatat cgtttacata cgggccgatt atactgaatg gagacgggtat ggattattat
 1321 gagagcccac tgttgactc cggatggctt accattctc ccaagaacgg aacagtcctt
 1381 ggattgataa acaaagcaag tagaggagac cagttcactg taatccccca tgtgttgaca
 1441 ttgcgcccc ggaatcaag tagaaattgt tattaccta ttcaaacatc ccagattatg
 1501 gataaagatg tccttactga gtccaatcta gtggtgttc ctacacagaa ttttagatat
 1561 gtcgtagcaa catatgatat atcacgggac gatcatgcca ttgtttatta tgtttatgac
 1621 ccaatacggg cgatttctta tacgtacca ttagactaa ctaccaaggg tagacctgat
 1681 ttctaagga ttgagtgtt cgtgtgggat gacgatttgt ggtgtcatca gttttaccga
 1741 ttcgaggccg acatcaccaa ctctacaacc agtgtcgaga atttagtccg tatgagcttc
 1801 tcatgtaacc gttcaaaacc ttga

LOCUS Seq2 1824 bp mRNA linear VRL 16-APR-2020
 DEFINITION Canine morbillivirus strain strain CDV23 isolate canine distemper
 virus.

ACCESSION Seq2

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE Canine morbillivirus

ORGANISM Canine morbillivirus

Viruses; Riboviria; Negarnaviricota; Haploviricotina;
 Monjiviricetes; Mononegavirales; Paramyxoviridae;
 Orthoparamyxovirinae; Morbillivirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1824)

AUTHORS Gutierrez,C., Oviedo,N., Manchego,A. and Rojas,M.

TITLE Genotyping of canine distemper virus lineages present in domestic
dogs (Canis lupus familiaris) from metropolitan Lima, Peru

JOURNAL unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1824)

AUTHORS Gutierrez,C., Oviedo,N., Manchego,A. and Rojas,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (16-APR-2020) Inmunologia y virologia veterinaria,
Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Avenida circunvalacion
cdra 28, San Borja, Lima, Lima 51, Peru

COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:mrojasmontes@gmail.com

Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:8

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1824
/organism="Canine morbillivirus"
/mol_type="mRNA"
/strain="strain CDV23"
/isolate="canine distemper virus"
/isolation_source="urine"
/host="Canis lupus familiaris"
/db_xref="taxon:11232"
/country="Peru"
/collection_date="19-Nov-2018"
gene <1..>1824
/gene="H"
mRNA <1..>1824

```

        /gene="H"
        /product="Hemagglutinin"
CDS      <1..1824
        /gene="H"
        /note="possible new genotype of canine distemper virus"
        /codon_start=1
        /product="Hemagglutinin"
        /product="H"
        /translation="MLSYRDKVGAFYKDNARANSSKLSLVTEEQGRRPPYLLFVLLI

```

LLVGIMALLAITGVRFHQVSTSNTEFSRLLKEDMEKSEAVHHQVLDVWTPLPFIIVHE

IALRSPQKLNEIKQFILQKTNFFNPNREFDFRDLHWCINPPSKIKVNFTNYCDTIGIR

KSIASAASPLLLSALSGGRGDIFPPYRCNGATISVGKIFPLSVLSMSLISRTSEIIN

MLTAISGGVYGKTYLLMPDYTEGEFDTQKIRVFEIGFIKRWLNDMPLLQTTNYMVLPE

NYKAKVCTIAVGELTLASLCVDESTVSLYHDSNGSQDGVLVVTMGIFGATSMDQVEEV

IPVAHPLVEKIHITNHRGIIKDSIATWMVPALVSEKQEEQKNCLESACQRKSYPMCNO

TSWEPFGGGQLPSYGRLTLPLDPSIDLQLNISFTYGPIILNGDGMDYYESPLLDGWL

TIPPKNGTVLGLINKASRGDQFTVIPHVLTAFAPRESSRNCYLP IQTSQIMDKDVLTES

NLVVLPTQNFYVYVATYDISRVDHAIVYYVYDPIRTISYTPFRLTTKGRPDFLRIEC

FVWDDDLWCHQFYRFEADITNSTTSVENLVRMSFSCNRSKP"

BASE COUNT 541 a 387 c 390 g 506 t

ORIGIN

1 atgctctcct accgagacaa ggtgggtgcc ttctataagg acaatgctag agctaattca

61 tccaagctgt ccctagtgac agaagagcaa gggggcagga gaccacccta tttgctgtt
 121 gtccttctca tctactggt tgggatcatg gccttgcttg ctatcactgg agttcgattt
 181 caccaagtat caactagcaa tacggaattt agcagattgc tgaaagagga tatggagaaa
 241 tcagaggccg tacatcacca agtcttagat gtctggacac cgctcttccc gattattgta
 301 catgagattg cattacggtc cccacaaaaa ctaaacgaga tcaaacaatt tctccttcaa
 361 aagacaaact tcttcaatcc gaacagggaa ttcgacttcc gcgatctcca ctgggtgcatt
 421 aaccaccta gtaagatcaa ggtgaattt actaattact gcgatactat tgggatcaga
 481 aagtctattg catcggcagc aagtcactc ctttatcag cactctccgg aggcagaggt
 541 gacatattcc caccatacag atgcaatggg gctactattt cagtaggcaa gatttccct
 601 ctatcagtat cattatctat gtcttggatc tcaagaacat cagagataat caatatgcta
 661 actgctatct caggcggagt gtatggtaaa acttatttac taatgcctga ttatactgaa
 721 ggggagttcg acacgcaaaa gattcgtgtc ttgagatag ggttcatcaa acggtggctg
 781 aatgacatgc cattactcca gacaaccaac tatatgggtc tcccggagaa ttacaaagct
 841 aaagtatgca ctatagcagt gggcgagttg aactggctt cttgtgtgt agatgagagc
 901 accgtatcgt tatatcatga cagcaatggg tcacaagatg gtgttctagt agtgacgatg
 961 ggaatatttg gggcaacatc tatggatcaa gttgaagagg tgatacctgt cgctcaccca
 1021 ttagtagaaa aaatacatat aacaaatcac cgtgggatca taaaagattc aatagcaacc
 1081 tggatggtgc ctgcattagt ttctgagaaa caagaggaac aaaaaaattg tctagagtca
 1141 gcttgcaaa gaaaatccta ccctatgtgc aatcaaacgt catgggaacc ctttggagga
 1201 ggacagttgc catcttatgg gcgattgaca ttaccttag atccgagcat tgaccttcaa
 1261 cttaacatat cgttacata cgggtccgatt atactgaatg gagacggtat ggattattat
 1321 gagagcccac tgttgactc cggatggctt accattctc ccaagaacgg aacagtcctt
 1381 ggattgataa acaaagcaag tagaggagac cagttcactg taatccccca tgtgttgaca
 1441 ttgcgcccga gggaatcaag tagaaattgt tatttacctt tcaaacatc ccagattatg
 1501 gataaagatg tccttactga gtccaatcta gtggtgttc ctacacagaa ttttagatat
 1561 gtcgtagcaa catatgatat atcacgggtc gaccatgcga ttgtttatta tgtttatgac
 1621 ccaatacggga cgatttctta tacgtacca tttagactaa ctaccaaggg tagacctgat
 1681 ttcttaagga ttgagtgtt tgtgtgggat gacgattgt ggtgtcatca gttttaccga
 1741 ttcgaggccg acatcaccaa ctctacaacc agtgtcgaga atttagtccg tatgagcttc
 1801 tcatgtaacc gttcaaaacc ttga

LOCUS Seq3 1824 bp mRNA linear VRL 16-APR-2020

DEFINITION Canine morbillivirus strain strain CDV25 isolate canine distemper virus.

ACCESSION Seq3

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE Canine morbillivirus

ORGANISM Canine morbillivirus

Viruses; Riboviria; Negarnaviricota; Haploviricotina; Monjiviricetes; Mononegavirales; Paramyxoviridae; Orthoparamyxovirinae; Morbillivirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1824)

AUTHORS Gutierrez,C., Oviedo,N., Manchego,A. and Rojas,M.

TITLE Genotyping of canine distemper virus lineages present in domestic dogs (*Canis lupus familiaris*) from metropolitan Lima, Peru

JOURNAL unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1824)

AUTHORS Gutierrez,C., Oviedo,N., Manchego,A. and Rojas,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (16-APR-2020) Inmunologia y virologia veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Avenida circunvalacion cdra 28, San Borja, Lima, Lima 51, Peru

COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:mrojasmontes@gmail.com

Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:8

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..1824
	/organism="Canine morbillivirus"
	/mol_type="mRNA"
	/strain="strain CDV25"
	/isolate="canine distemper virus"
	/isolation_source="urine"
	/host="Canis lupus familiaris"
	/db_xref="taxon:11232"
	/country="Peru"
	/collection_date="23-Nov-2018"
gene	<1..>1824
	/gene="H"
mRNA	<1..>1824
	/gene="H"
	/product="Hemagglutinin"
CDS	<1..1824
	/gene="H"
	/note="possible new genotype of canine distemper virus"
	/codon_start=1
	/product="Hemagglutinin"
	/product="H"
	/translation="MLSYRDKVGAFYKDNARANSSKLSLVTEEQGRRPPYLLFVLLI

LLVGIMALLAITGVRFHQVSTSNTEFSRLLKEDMEKSEAVHHQVLDVWTPFFPIEVHE

IAFRSPQKLNEIKQFILQKTNFFNPNREFDFRDLHWCINPPSKIKVNFTNYCDTIGIR

KSIASAANPILLSALSGGRGDIFPPYRCNGATISVGKIFPLSVLSMSLISRTSEIIN

MLTAISGGVYGKTYLLMPDYTEGEFDTQKIRVFEIGFIKRWLNDMPLLQTTNYMVLPE

NYKAKVCTIAVGELTLASLCVDESTVSLYHDSNGSQDGLVVMTMGIFGATSMDQVEEV

IPVAHPLVEKIHITNHRGIIKDSIATWMVPALVSEKQEEQKNCLESACQRKSYPMCNQ

TSWEPFGGGQLPSYGRLTLPLDPSIDLQLNISFTYGPIILNGDGMDYYESPLLD SGWL

TIPPKNGTVLGLINKASRGDRFTVIPHVLT FAPRESSRNCYLP IQTSQIMDKDVLTES

NLVVLPTQNF RYVVATYDISRDDHAIVYYVYDPIRTISYTPFRLTTKGRPD FLRIEC

FVWDDDLWCHQFYRFEADITNSTTSVENLVRMSFSCNRSKP"

BASE COUNT 541 a 386 c 392 g 505 t

ORIGIN

```
1 atgctctcct accgagacaa ggtgggtgcc ttctataagg acaatgctag agctaattca
61 tccaagctgt ccctagtgac agaagagcaa gggggcagga gaccacccta ttgctgttt
121 gtccttctca tcctactggt tgggatcatg gccttgcttg ctatcactgg agttcgattt
181 caccaagtat caactagcaa tacggaattt agcagattgc tgaaagagga tatggagaaa
241 tcagaggccg tacatcacca agtcttagat gtctggacac cgttttccc gattgaggta
301 catgagattg cattccggtc cccacaaaaa ctaaacgaga tcaaacaatt tatccttcaa
361 aagacaaact tcttcaatcc gaacagggaa ttcgacttcc gcgatctcca ctgggtgcatt
421 aaccaccta gtaagatcaa ggtgaatttt actaattact gcgatactat tgggatcaga
481 aaatctattg catcggcagc aaatcccatc cttttatcag cactctccgg aggcagaggt
541 gacatatcc caccatacag atgcaatggg gctactattt cagtaggcaa gattttccct
601 ctgtcagtat cattatctat gtctttgac tcaagaacat cagagataat caatatgcta
661 actgctatct caggcggagt gtatggtaaa acttatttac taatgcctga ttatactgaa
721 ggggagttcg acacgcaaaa gattcggtgc ttgagatag ggttcatcaa acggtggctg
781 aatgacatgc cattactcca gacaaccaac tatatggtcc tcccggagaa ttacaaagct
841 aaagtatgca ctatagcagt gggcgagttg aactggctt ctttgtgtgt agatgagagc
901 accgtatcgt tatatcatga cagcaatggt tcacaagatg gtgttctagt agtgacgatg
961 ggaatatccg gggcaacatc tatggatcaa gttgaagagg tgatacctgt cgctcaccca
1021 ttagtagaaa aaatacatat aacaaatcac cgtgggatca taaaagattc aatagcaacc
```

1081 tggatggtgc ctgcattagt ttctgagaaa caagaggaac aaaaaaattg tctagagtca
 1141 gcttgtcaaa gaaaatccta ccctatgtgc aatcaaacgt catgggaacc ctttgaggga
 1201 ggacagttgc catcttatgg gcgattgaca ttaccttag atccgagcat tgacctcaa
 1261 cttaacatat cgtttacata cgggtccgatt atactgaatg gagacggtat ggattattat
 1321 gagagcccac tgttgactc cggatggctt accattcctc ccaagaacgg aacagtcctt
 1381 ggattgataa acaaagcaag tagaggagac cggttcactg taatcccca tgtgttgaca
 1441 ttgcgcca gggaatcaag tagaaattgt tattaccta ttcaaaccatc ccagattatg
 1501 gataaagatg tccttactga gtccaatcta gtggtgtgac ctacacagaa ttttagatat
 1561 gtcgtagcaa catatgatat atcacgggac gatcatgcca ttgtttatta tgtttatgac
 1621 ccaatacggc cgatttctta tacgtaccca ttagactaa ctaccaaggg tagacctgat
 1681 ttctaagga ttgagtgtt tgtgtgggat gacgattgt ggtgtcatca gttttaccga
 1741 ttcgaggccg acatcaccaa ctctacaacc agtgtcgaga atttagtccg tatgagcttc
 1801 tcatgtaacc gttcaaaacc ttga

LOCUS Seq4 1824 bp mRNA linear VRL 16-APR-2020
 DEFINITION Canine morbillivirus strain strain CDV29 isolate canine distemper
 virus.
 ACCESSION Seq4
 VERSION
 KEYWORDS .
 SOURCE Canine morbillivirus
 ORGANISM Canine morbillivirus
 Viruses; Riboviria; Negarnaviricota; Haploviricotina;
 Monjiviricetes; Mononegavirales; Paramyxoviridae;
 Orthoparamyxovirinae; Morbillivirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1824)
 AUTHORS Gutierrez,C., Oviedo,N., Manchego,A. and Rojas,M.
 TITLE Genotyping of canine distemper virus lineages present in domestic
 dogs (*Canis lupus familiaris*) from metropolitan Lima, Peru

JOURNAL unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1824)

AUTHORS Gutierrez,C., Oviedo,N., Manchego,A. and Rojas,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (16-APR-2020) Inmunologia y virologia veterinaria,
 Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Avenida circunvalacion
 cdra 28, San Borja, Lima, Lima 51, Peru

COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:mrojasmontes@gmail.com
 Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:8

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..1824
	/organism="Canine morbillivirus"
	/mol_type="mRNA"
	/strain="strain CDV29"
	/isolate="canine distemper virus"
	/isolation_source="urine"
	/host="Canis lupus familiaris"
	/db_xref="taxon:11232"
	/country="Peru"
	/collection_date="11-Dec-2018"
gene	<1..>1824
	/gene="H"
mRNA	<1..>1824
	/gene="H"
	/product="Hemagglutinin"
CDS	<1..1824
	/gene="H"

/note="possible new genotype of canine distemper virus"
/codon_start=1
/product="Hemagglutinin"
/product="H"
/translation="MLSYRDKVGAFYKDNARANSSKLSLVTEEQGRRPPYLLFVLLI

LLVGIMALLAITGVRFHQVSTSNTEFSRLLXEDMEKSEAVHHQVIDVLTPLFKIIGDE

IGLRLPQKLNEIKQFILQKTNFFNPNREFDFRDLHWCINPPSKIKVNFTNYCDTIGIR

KSIASAANPILLSALSGGRGDIFPPYRCNGATISVGKIFPLSVLSMSLISRTSEIIN

MLTAISGGVYGKTYLLMPDYTEGEFDTQKIRVFEIGFIKRWLNNMPLLQTTNYMVLPA

NYKAKVCTIAVGELALASLCVDESTVSLYHDSNGSQDGVLVVTMGIFGATSMDQVEEV

IPVAHPLVEKIHITNHRGIIKDSIATWMVPALVSEKQEEQKNCLESACQRKSYPMCNO

TSWEPFGGGQLPSYGRLTLPLDPSIDLQLNISFTYGPIILNGDGMDYYESPLLD SGWL

TIPPKNGTVLGLINKASRGDQFTVIPHVLTAFAPRESSRNCYLP IQTSQIMDKDVLTES

NLVVLPTQNFYVYVATYDISRDDHAIVYYVYDPIRTISYTFRLTTKGRPDFLRIEC

FVWDDDLWCHQFYRFEADITNSTTSVENLVRMSFSCNRSKP"

BASE COUNT 545 a 382 c 391 g 505 t 1 others

ORIGIN

1 atgctctcct accgagacaa ggtgggtgcc ttctataagg acaatgctag agctaattca
61 tccaagctgt ccctagtgac agaagagcaa gggggcagga gaccacccta ttgctgttt
121 gtccttctca tcctactggt tgggatcatg gccttgcttg ctatcactgg agttcgattt
181 caccaagtat caactagcaa tacggaattt agcagattgc tgaragagga tatggagaaa
241 tcagaggccg tacatcacca agtcatagat gtcttgacac cgctcttcaa aattattgga

301 gatgagattg gattacgggt gccacaaaaa ctAACGAGA tcaaacaatt tAtccttcaa
 361 aagacaaact tcttcaatcc gaacagggaa ttGacttcc gCgatctcca ctgggtgcatt
 421 aaccaccta gtaagatcaa ggtgaatTTT actaattact gCgatactat tgggatcaga
 481 aaatctattg catcggcagc aaatcccatc cttttatcag cactctccgg aggcagaggt
 541 gacatattcc caccatacag atgcaatggg gccactattt cagtaggcaa gattttccct
 601 ctatcagtat cattatctat gtctttgatc tcaagaacat cagagataat caatatgcta
 661 actgctatct caggcggagt gtatggtaaa acttatttac taatgcctga ttatactgaa
 721 ggggagttcg acacgcaaaa gattcggtgc ttgagatag ggttcatcaa gcggtggctg
 781 aataacatgc cattactcca gacaaccaac tatatggtcc tcccggcgaa ttacaaagct
 841 aaagtatgca ctatagcagt gggcgagttg gcactggctt ctttgtgtgt agatgagagc
 901 accgtatcgt tatatcatga cagcaatggg tcacaagatg gtgttttagt agtgacgatg
 961 ggaatattcg gggcaacatc tatggatcaa gtgaagagg tgatacctgt cgctaccca
 1021 ttagtagaaa aaatacatat aacaaatcac cgtgggatca taaaagattc aatagcaacc
 1081 tggatggtgc ctgcattagt ttctgagaaa caagaggaac aaaaaaattg tctagagtca
 1141 gcttgtcaaa gaaaatccta ccctatgtgc aatcaaacgt catgggaacc ctttgagga
 1201 ggacagttgc catcttatgg gcgattgaca ttaccttag atccgagcat tgacctcaa
 1261 cttaacatat cgtttacata cgggccgatt atactgaatg gagacgggat ggattattat
 1321 gagagcccac tgttgactc cggatggctt accattcctc ccaagaacgg aacagtcctt
 1381 ggattgataa acaaagcaag tagaggagac cagttcactg taatccccca tgtgttgaca
 1441 ttgcgcccga gggaatcaag tagaaattgt tatttaccta ttcaaacatc ccagattatg
 1501 gataaagatg tccttactga gtccaatcta gtggtgttgc ctacacagaa ttttagatat
 1561 gtcgtagcaa catatgatat atcacgggac gatcatgcca ttgtttatta tgtttatgac
 1621 ccaatacggga cgatttcta tacgtacca tttagactaa ctaccaagg tagacctgat
 1681 ttctaagga ttgagtgtt tgtgtgggat gacgattgt ggtgtcatca gttttaccga
 1741 ttcgaggccg acatcaccaa ctctacaacc agtgtcgaga atttagtccg tatgagcttc
 1801 tcatgtaacc gtcaaaacc ttga

LOCUS Seq5 1824 bp mRNA linear VRL 16-APR-2020

DEFINITION Canine morbillivirus strain strain CDV31 isolate canine distemper virus.

ACCESSION Seq5

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE Canine morbillivirus

ORGANISM Canine morbillivirus

Viruses; Riboviria; Negarnaviricota; Haploviricotina; Monjiviricetes; Mononegavirales; Paramyxoviridae; Orthoparamyxovirinae; Morbillivirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1824)

AUTHORS Gutierrez,C., Oviedo,N., Manchego,A. and Rojas,M.

TITLE Genotyping of canine distemper virus lineages present in domestic dogs (*Canis lupus familiaris*) from metropolitan Lima, Peru

JOURNAL unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1824)

AUTHORS Gutierrez,C., Oviedo,N., Manchego,A. and Rojas,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (16-APR-2020) Inmunologia y virologia veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Avenida circunvalacion cdra 28, San Borja, Lima, Lima 51, Peru

COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:mrojasmontes@gmail.com

Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:8

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1824

/organism="Canine morbillivirus"

```

/mol_type="mRNA"
/strain="strain CDV31"
/isolate="canine distemper virus"
/isolation_source="urine"
/host="Canis lupus familiaris"
/db_xref="taxon:11232"
/country="Peru"
/collection_date="11-Dec-2018"
gene      <1..>1824
          /gene="H"
mRNA      <1..>1824
          /gene="H"
          /product="Hemagglutinin"
CDS       <1..1824
          /gene="H"
          /note="possible new genotype of canine distemper virus"
          /codon_start=1
          /product="Hemagglutinin"
          /product="H"
          /translation="MLSYRDKVGAFYKDNARANSSKLSLVTEEQGRRPPYLLFVLLI

```

LLVGIMALLAITGVRFHQVSTSNTEFSRLLKEDMEKSEAVHHQVIDVLTPLFKIIGDE

IGLRLPQKLNEIKQFILQKTNFFNPNREFDFRDLHWCINPPSKIKVNFTNYCDTIGIR

KSIASAANPILLSALSGGRGDIFPPYRCNGATISVGKIFPLSVSLSMSLISRTSEIIN

MLTAISGGVYGKTYLLMPDYTEGEFDTQKIRVFEIGFIKRWLNNMPLLQTTNYMVLPA

NYKAKVCTIAVGELALASLCVDESTVSLYHDSNGSQDGVLVVMTMGIFGATSMDQVEEV

IPVAHPLVEKIHITNHRGIIKDSIVTWMVPALVSEKQEEQKNCLESACQRKSYPMCQNQ

TSWEPFGGGQLPSYGRLTLPLDPSIDLQLNISFTYGPIILNGDGMDYYESPLLD SGWL

TIPPKNGTVLGLINKASRGDQFTVIPHVLTFAPRESSRNCYLPIQTSQIMDKDVLTES

NLVVLPTQNFYRVVATYDISRDDHAIVYYVYDPIRTISYTPFRLTTKGRPDFLRIEC

FVWDDDLWCHQFYRFEADITNSTTSVENLVRMSFSCNRSKP"

BASE COUNT 546 a 381 c 391 g 506 t

ORIGIN

```
1 atgctctcct accgagacaa ggtgggtgcc ttctataagg acaatgctag agctaattca
61 tccaagctgt ccctagtgac agaagagcaa gggggcagga gaccacccta ttgctgttt
121 gtccttctca tcctactggt tgggatcatg gccttgcttg ctatcactgg agttcgattt
181 caccaagtat caactagcaa tacggaattt agcagattgc tgaaagagga tatggagaaa
241 tcagaggccg tacatcacca agtcatagat gtcttgacac cgctcttcaa aattattgga
301 gatgagattg gattacggtt gccacaaaaa ctaaacgaga tcaaacaatt tatccttcaa
361 aagacaaact tctcaatcc gaacagggaa ttcgacttcc gcgatctcca ctggtgcatt
421 aaccaccta gtaagatcaa ggtgaatttt actaattact gcgatactat tgggatcaga
481 aaatctattg catcggcagc aaatcccatc ctttatcag cactctccgg aggcagaggt
541 gacatattcc caccatacag atgcaatggg gctactattt cagtaggcaa gattttccct
601 ctatcagtat cattatctat gtctttgatc tcaagaacat cagagataat caatatgcta
661 actgctatct caggcggagt gtatggtaaa acttatttac taatgcctga ttactgaa
721 ggggagttcg acacgcaaaa gattcggtgc ttgagatag ggttcatcaa gcggtggctg
781 aataacatgc cattactcca gacaaccaac tatatggtcc tcccggcgaa ttacaaagct
841 aaagtatgca ctatagcagt gggcgagttg gcactggctt ctttgtgtgt agatgagagc
901 accgtatcgt tatatcatga cagcaatggt tcacaagatg gtgttttagt agtgacgatg
961 ggaatattcg gggcaacatc tatggatcaa gttgaagagg tgatacctgt cgctcaccca
1021 ttagtagaaa aaatacatat aacaaatcac cgtgggatca taaaagattc aatagtaacc
1081 tggatggtgc ctgcattagt ttctgagaaa caagaggaac aaaaaaattg tctagagtca
1141 gcttgtaaaa gaaaatccta ccctatgtgc aatcaaacgt catgggaacc ctttgaggga
```

1201 ggacagttgc catcttatgg gcgattgaca ttacctctag atccgagcat tgaccttcaa
 1261 cttacatat cgtttacata cgggccgatt atactgaatg gagacggtat ggattattat
 1321 gagagcccac tgttgactc cggatggctt accattcctc ccaagaacgg aacagtcctt
 1381 ggattgataa acaaagcaag tagaggagac cagttcactg taatccccc tggtgtgaca
 1441 ttgcgcccga gggaatcaag tagaaattgt tattaccta ttcaaacatc ccagattatg
 1501 gataaagatg tccttactga gtccaatcta gtggtgttgc ctacacagaa ttttagatat
 1561 gtcgtagcaa catatgatat atcacgggac gatcatgcga ttgtttatta tgtttatgac
 1621 ccaatacggga cgatttctta tacgtaccca ttagactaa ctaccaaggg tagacctgat
 1681 ttctaagga ttgagtgttt cgtgtgggat gacgatttgt ggtgtcatca gttttaccga
 1741 ttcgaggccg acatcaccaa ctctacaacc agtgtcgaga atttagtccg tatgagcttc
 1801 tcatgtaacc gttcaaaacc ttga

LOCUS Seq6 1824 bp mRNA linear VRL 16-APR-2020
 DEFINITION Canine morbillivirus strain strain CDV36 isolate canine distemper
 virus.
 ACCESSION Seq6
 VERSION
 KEYWORDS .
 SOURCE Canine morbillivirus
 ORGANISM Canine morbillivirus
 Viruses; Riboviria; Negarnaviricota; Haploviricotina;
 Monjiviricetes; Mononegavirales; Paramyxoviridae;
 Orthoparamyxovirinae; Morbillivirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1824)
 AUTHORS Gutierrez,C., Oviedo,N., Manchego,A. and Rojas,M.
 TITLE Genotyping of canine distemper virus lineages present in domestic
 dogs (*Canis lupus familiaris*) from metropolitan Lima, Peru
 JOURNAL unpublished
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1824)
 AUTHORS Gutierrez,C., Oviedo,N., Manchego,A. and Rojas,M.

TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (16-APR-2020) Inmunologia y virologia veterinaria,
Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Avenida circunvalacion
cdra 28, San Borja, Lima, Lima 51, Peru
COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:mrojasmontes@gmail.com
Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:8

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..1824 /organism="Canine morbillivirus" /mol_type="mRNA" /strain="strain CDV36" /isolate="canine distemper virus" /isolation_source="urine" /host="Canis lupus familiaris" /db_xref="taxon:11232" /country="Peru" /collection_date="11-Dec-2018"
gene	<1..>1824 /gene="H"
mRNA	<1..>1824 /gene="H" /product="Hemagglutinin"
CDS	<1..1824 /gene="H" /note="possible new genotype of canine distemper virus" /codon_start=1 /product="Hemagglutinin"

/product="H"

/translation="MLSYRDKVGAFYKDNARANSSKLSLVTEEQGRRPPYLLFVLLI

LLVGIMALLAITGVRFHQVSTSNTEFSRLLKEDMEKSEAVHHQVIDVLTPLFKIIGDE

IGLRLPQKLNEIKQFILQKTNFFNPREFDFRDLHWCINPPSKIKVNFTNYCDTIGIR

KSIASAANPILLSALSGGRGDIFPPYRCNGATISVGKIFPLSVLSMSLISRTSEIN

MLTAISGGVYGKTYLLMPDYTEGEFDTQKIRVFEIGFIKRWLNNMPLLQTTNYMVLPA

NYKAKVCTIAVGELALASLCVDESTVSLYHDSNGSQDGVLVVTMGIFGATSMDQVEEV

IPVAHPLVEKIHITNHRGIIKDSIATWMVPALVSEKQEEQKNCLESACQRKSYPMCNO

TSWEPFGGGQLPSYGRLTLPLDPSIDLQLNISFTYGPIILNGDGMDYYESPLLDGWL

TIPPKNGTVLGLINKASRGDQFTVIPHVLTAFAPRESSRNCYLP IQTSQIMDKDVLTES

NLVVLPTQNFYVATYDISRDDHAIVYYVYDPIRTISYTPFRLTTKGRPDFLRIEC

FVWDDDLWCHQFYRFEADITNSTTSVENLVRMSFSCNRSKP"

BASE COUNT 545 a 380 c 392 g 507 t

ORIGIN

1 atgctctcct accgagacaa ggtgggtgcc ttctataagg acaatgctag agctaattca
61 tccaagctgt ccctagtac agaagagcaa gggggcagga gaccacccta ttgctgttt
121 gtccttctca tcctactggt tgggatcatg gccttgcttg ctatcactgg agttcgattt
181 caccaagtat caactagcaa tacggaattt agcagattgc tgaaagagga tatggagaaa
241 tcagaggccg tacatcacca agtcatagat gtcttgacac cgctcttcaa aattattgga
301 gatgagattg gattacggtt gccacaaaaa ctaaacgaga tcaaacaatt tctcctcaa
361 aagacaaact tctcaatcc gaacaggga ttcgacttcc gcgatctcca ctgggtgcatt
421 aaccacaccta gtaagatcaa ggtgaatttt actaattact gcgatactat tgggatcaga

481 aaatctattg catcggcagc aaatcccatc cttttatcag cactctccgg aggcagaggt
 541 gacatatcc caccatacag atgcaatggg gctactattt cagtaggcaa gattttccct
 601 ctatcagtat cattatctat gtctttgatc tcaagaacat cagagataat caatatgcta
 661 actgctatct caggcggagt gtatggtaaa acttatttac taatgcctga ttatactgaa
 721 ggggagttcg acacgcaaaa gattcgtgtc ttgagatag ggttcatcaa gcggtggctg
 781 aataacatgc cattactcca gacaaccaac tatatgggcc tcccggcgaa ttacaaagct
 841 aaagtatgca ctatagcagt gggcgagttg gcactggctt ctttgttgt agatgagagc
 901 accgtatcgt tatatcatga cagcaatggg tcacaagatg gtgttttagt agtgacgatg
 961 ggaatatctg gggcaacatc tatggatcaa gttgaagagg tgatacctgt cgctcaccca
 1021 ttagtagaaa aaatacatat aacaaatcac cgtgggatca taaaagattc aatagcaacc
 1081 tggatgggtc ctgcattagt ttctgagaaa caagaggaac aaaaaaattg tctagagtca
 1141 gcttgtcaaa gaaaatccta ccctatgtgc aatcaaacgt catgggaacc ctttggagga
 1201 ggacagttgc catcttatgg gcgattgaca ttaccttag atccgagcat tgacctcaa
 1261 cttaacatat cgtttacata cgggccgatt atactgaatg gagacggtat ggattattat
 1321 gagagcccac tgttggactc cggatggctt accattctc ccaagaacgg aacagtcctt
 1381 ggattgataa acaaagcaag tagaggagac cagttcactg taatccccca tgtgttgaca
 1441 ttgcgcccc gggaatcgag tagaaattgt tatttaccta ttcaaacatc ccagattatg
 1501 gataaagatg tccttactga gtccaatcta gtggtgttc ctacacagaa ttttagatat
 1561 gtcgtagcaa catatgatat atcacgggat gatcatgcga ttgtttatta tgtttatgac
 1621 ccaatacggg cgatttctta tacgtacca ttagactaa ctaccaaggg tagacctgat
 1681 ttctaagga ttgagtgtt tgtgtgggat gacgattgt ggtgtcatca gttttaccga
 1741 ttgaggccg acatcaccaa ctctacaacc agtgtcgaga atttagtccg tatgagcttc
 1801 tcatgtaacc gttcaaaacc ttga

LOCUS Seq7 736 bp mRNA linear VRL 16-APR-2020
 DEFINITION Canine morbillivirus strain strain CDV06 isolate canine distemper
 virus.
 ACCESSION Seq7
 VERSION

KEYWORDS .

SOURCE Canine morbillivirus

ORGANISM Canine morbillivirus

Viruses; Riboviria; Negarnaviricota; Haploviricotina;
Monjiviricetes; Mononegavirales; Paramyxoviridae;
Orthoparamyxovirinae; Morbillivirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 736)

AUTHORS Gutierrez,C., Oviedo,N., Manchego,A. and Rojas,M.

TITLE Genotyping of canine distemper virus lineages present in domestic
dogs (Canis lupus familiaris) from metropolitan Lima, Peru

JOURNAL unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 736)

AUTHORS Gutierrez,C., Oviedo,N., Manchego,A. and Rojas,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (16-APR-2020) Inmunologia y virologia veterinaria,
Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Avenida circunvalacion
cdra 28, San Borja, Lima, Lima 51, Peru

COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:mrojasmontes@gmail.com

Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:8

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..736
/organism="Canine morbillivirus"
/mol_type="mRNA"
/strain="strain CDV06"
/isolate="canine distemper virus"
/isolation_source="urine"
/host="Canis lupus familiaris"

```

/db_xref="taxon:11232"
/country="Peru"
/collection_date="05-Oct-2018"
gene      <1..>736
          /gene="H"
mRNA      <1..>736
          /gene="H"
          /product="Hemagglutinin"
CDS       <16..736
          /gene="H"
          /note="possible new genotype of canine distemper virus"
          /codon_start=1
          /product="Hemagglutinin"
          /product="H"

/translation="MVPALVSEKQEEQKNCLESACQRKSYPMCNQTSWEPFGGGQLPS
YGRLLPLDPSIDLQLNISFTYGPIILNGDGMDYYESPLLD SGWLTIPPKNGTVLGLI
NKASRGDQFTVIPHVLT FAPRESSRNCYLPIQTSQIMDKDVLTESNLVVLPTQNFRYV
VATYDISRDDHAIVYYVYDPIRTISYTPFRLTTKGRPDFLRIECFWDDDLWCHQFY
RFEADITNSTTSVENLVRMSFS"
BASE COUNT   215 a   151 c   157 g   213 t
ORIGIN
    1 tcaatagtaa cctggatggt gcctgcatta gtttctgaga aacaagagga acaaaaaaat
   61 tgtctagagt cagctgtgca aagaaaatcc taccctatgt gcaatcaaac gtcatgggaa
  121 cccttggag gagacagtt gccatcttat gggcgattga cattacctct agatccgagc
  181 attgaccttc aacttaacat atcgtttaca tacggtccga ttatactgaa tggagacggt
  241 atggattatt atgagagccc actgttggac tccggatggc ttaccattcc tccaagaac
  301 ggaacagtcc ttggattgat aaacaaagca agtagaggag accagttcac tgtaatcccc

```

361 catgtgttga catttgcgcc cagggaaatca agtagaaatt gttatttacc tattcaaaca
421 tcccagatta tggataaaga tgccttact gagtccaatc tagtgggtgt gcctacacag
481 aattttagat atgtcgtagc aacatatgat atatcacggg acgatcatgc gattgtttat
541 tatgtttatg acccaatacg gacgatttct tatacgtacc catttagact aactaccaag
601 ggtagacctg atttcttaag gattgagtgt ttcgtgtggg atgacgattt gtggtgtcat
661 cagttttacc gattcgaggc cgacatcacc aactctacaa ccagtgtcga gaatttagtc
721 cgtatgagct tctcat

LOCUS Seq8 736 bp mRNA linear VRL 16-APR-2020

DEFINITION Canine morbillivirus strain strain CDV28 isolate canine distemper
virus.

ACCESSION Seq8

VERSION

KEYWORDS .

SOURCE Canine morbillivirus

ORGANISM Canine morbillivirus

Viruses; Riboviria; Negarnaviricota; Haploviricotina;
Monjiviricetes; Mononegavirales; Paramyxoviridae;
Orthoparamyxovirinae; Morbillivirus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 736)

AUTHORS Gutierrez,C., Oviedo,N., Manchego,A. and Rojas,M.

TITLE Genotyping of canine distemper virus lineages present in domestic
dogs (*Canis lupus familiaris*) from metropolitan Lima, Peru

JOURNAL unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 736)

AUTHORS Gutierrez,C., Oviedo,N., Manchego,A. and Rojas,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (16-APR-2020) Inmunologia y virologia veterinaria,
Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Avenida circunvalacion
cdra 28, San Borja, Lima, Lima 51, Peru

COMMENT Bankit Comment: ALT EMAIL:mrojasmontes@gmail.com
Bankit Comment: TOTAL # OF SEQS:8

##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source	1..736
	/organism="Canine morbillivirus"
	/mol_type="mRNA"
	/strain="strain CDV28"
	/isolate="canine distemper virus"
	/isolation_source="urine"
	/host="Canis lupus familiaris"
	/db_xref="taxon:11232"
	/country="Peru"
	/collection_date="10-Oct-2018"
gene	<1..>736
	/gene="H"
mRNA	<1..>736
	/gene="H"
	/product="Hemagglutinin"
CDS	<16..736
	/gene="H"
	/note="possible new genotype of canine distemper virus"
	/codon_start=1
	/product="Hemagglutinin"
	/product="H"

/translation="MVPALVFEKQEEQKNCLESACQRKSYPMCNQTSWEPFGGGQLPS

YGRLTLPLDPSIDLQLNISFTYGPIILNGDGMDYYESPLLDSEWLTIPPKNGTVLGLI

NKASRGDQFTVIPHVLTFAPRESSRNCYLPIQTSQIMDKDVLTESNLVVLPTQNFRYV

VATYDISRDDHAIVYYVYDPIRTISYTYPFRLTTKGRPDFLRIECFVWDDDLWCHQFY

RFEADITNSTTSVENLVRMSFS"

BASE COUNT 216 a 151 c 156 g 213 t

ORIGIN

```
1 tcaatagcaa cctggatggt gcctgcatta gttttgaga aacaagagga acaaaaaaat
61 tgtctagagt cagcttgtca aagaaaatcc taccctatgt gcaatcaaac gtcatgggaa
121 ccctttggag gaggacagtt gccatcttat gggcgattga cattacctct agatccgagc
181 attgaccttc aacttaacat atcgtttaca tacgggtccga ttatactgaa tggagacggt
241 atggattatt atgagagccc actgttggac tccgaatggc ttaccattcc tccaagaac
301 ggaacagtcc ttggattgat aaacaaagca agtagaggag accagttcac tgtaatcccc
361 catgtgttga catttgcgcc cagggaatca agtagaaatt gttatttacc tattcaaaca
421 tccagatta tggataaaga tgccttact gagtccaatc tagtggtgtt gcctacacag
481 aattttagat atgtcgtagc aacatatgat atatcacggg acgatcatgc gattgtttat
541 tatgtttatg acccaatacg gacgatttct tatacgtacc catttagact aactaccaag
601 ggtagacctg atttcttaag gattgagtgt ttgtgtggg atgacgattt gtggtgtcat
661 cagttttacc gattcgaggc cgacatcacc aactctacaa ccagcgtcga gaatttagtc
721 cgtatgagct tctcat
```

//